

**Interaktion zytosolischer Peptidasen und deren Rolle bei der  
MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation des HLA-A2-restringierten  
HCMV pp65<sub>495-503</sub> Epitops**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Julia Paschke

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Stefan Hecht

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel

Gutachter: 2. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

Gutachter: 3. Prof. Dr. Ulrike Seifert

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2013



## Abstract (ger.)

MHC-Klasse-I präsentierte Epitope werden überwiegend durch den proteasomalen Abbau von Poly-Ubiquitin markierten Proteinen und defekten ribosomalen Produkten (DRiPs) generiert. Die post-proteasomale Prozessierung durch zytosolische Exo- und Endopeptidasen führt jedoch hauptsächlich zur Epitop-Zerstörung und nur ein sehr geringer Anteil der Peptide entkommt der Degradation. Bisher ist noch unklar, wie die enzymatischen Aktivitäten des heterogenen Peptidase-Pools im Zytosol die finale Epitop-Prozessierung beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden heteromere Interaktionen von zytosolischen Peptidasen analysiert und ihre Wirkung auf die Prozessierung und Präsentation von proteasomal generierten Vorläuferpeptiden in Bezug auf die HCMVpp65<sub>495-503</sub> Epitop-Generierung untersucht.

Glycerolgradientenzentrifugationen und Immunpräzipitationsexperimente zeigten, dass die zytosolischen Peptidasen Nardilysin (NRDc) und Aminopeptidase-B (AP-B) in den gleichen Fraktionen sedimentieren und zu heteromeren Komplexen interagieren. Die siRNA-abhängige Reduktion der Proteinexpression beider Peptidasen hatte einen positiven Effekt auf die HCMVpp65 spezifische CTL-Antwort. Demnach vermindert der Peptidase-Komplex die HCMVpp65-spezifische Epitop-Präsentation auf der Zelloberfläche. Im Gegensatz dazu bewirkte ein in vitro rekonstituierter trimerer Peptidase-Komplex jedoch die verstärkte HCMVpp65 Epitop-Generierung aus einem proteasomal generierten Vorläuferpeptid. Auf der anderen Seite führte gereinigte AP-B zu der anhaltenden Zerstörung des Epitops. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass sowohl einzelne als auch verschiedene Interaktionen von zytosolischen Peptidasen die Prozessierung und Präsentation des HCMVpp65-Epitops unterschiedlich modulieren und somit die HCMVpp65-spezifische antivirale Immunantwort beeinflussen.

## Schlagwörter

Antigenprozessierung / zytosolische Peptidasen / HCMVpp65 / Proteasom

## Abstract (eng.)

MHC class I presented antigens are generated by the degradation of poly-ubiquitinated proteins and defective ribosomal products (DRiPs) by a major protease, the 26S proteasome. However, the post-proteasomal processing by cytosolic exo- and endopeptidases mainly leads to epitope destruction and only a very small proportion of the peptides escape degradation. So far, it is still unclear how the enzymatic activity of the heterogeneous pool of peptidases in the cytosol affects final epitope processing and therewith immune response.

In the present work heteromeric interactions of cytosolic peptidases and their effect on processing and presentation of proteasomal generated peptides were analysed with regard to HCMVpp65<sub>495-503</sub> epitope generation.

Glycerol gradient centrifugation and immunoprecipitation experiments indicate that the cytosolic peptidases Nardilysine (NRDc) and Aminopeptidase B (AP-B) sediment in the same fractions and interact to heteromeric complexes. The siRNA dependent reduction of protein expression of these two peptidases had a positive effect on the HCMVpp65 specific CTL response. Thus the peptidase complex reduces HCMVpp65 epitope presentation on the cell surface possibly due to epitope destruction. In contrast to the findings of the CTL assays, an in vitro reconstituted trimeric peptidase complex resulted in the increased generation of HCMVpp65 epitopes from a proteasomal generated peptide precursor. On the other hand purified AP-B led to the ongoing destruction of the epitope. The findings obtained show that single cytosolic peptidases and various interactions of cytosolic peptidases regulate the processing and presentation of the HCMVpp65 epitope differently, thereby influencing the HCMV-specific antiviral immune response.

## keywords

antigen processing / cytosolic peptidases / HCMVpp65 / proteasome

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>1 Einleitung</b> .....	3
<b>1.1 Peptidasen und Proteasen</b> .....	3
1.1.1 Klassifizierung der Peptidasen .....	4
<b>1.2 Der MHC-Klasse-I-Antigen-Präsentationsweg</b> .....	7
1.2.1 Prozessierung von Vorläuferpeptiden durch zytosolische Peptidasen .....	10
1.2.2 Prozessierung von Vorläuferpeptiden durch ER-residente Peptidasen .....	16
<b>1.3 HCMVpp65 als Modellantigen</b> .....	17
<b>1.4 Ziel der Arbeit</b> .....	19
<b>2 Material und Methoden</b> .....	20
<b>2.1 Material</b> .....	20
2.1.1 Chemikalien/Verbrauchsmaterialien/Geräte .....	20
2.1.2 Zellkulturreagenzien .....	22
2.1.3 Substrate .....	22
2.1.4 Antikörper .....	23
2.1.5 Synthetische Peptide .....	24
<b>2.2 Methoden</b> .....	25
2.2.1 Zellbiologische Methoden .....	25
2.2.2 Biochemische Methoden .....	27
2.2.3 Immunologische Methoden .....	36
<b>3 Ergebnisse</b> .....	38
<b>3.1 Nachweis eines heteromeren Komplexes zytosolischer Peptidasen</b> .....	38
<b>3.2 Die Peptidasen AP-B und NRDC weisen gleiche Charakteristika bezüglich ihrer Sedimentation im Glycerolgradienten auf</b> .....	41
3.2.1 AP-B und NRDC können aus den Fraktionen des Glycerolgradienten ko-präzipitiert werden .....	44
<b>3.3 siRNA knockdown der beiden zytosolischen Peptidasen AP-B und NRDC führt zu einer erhöhten Epitop-Präsentation</b> .....	45
<b>3.4 Aufreinigung und Charakterisierung von AP-B und NRDC</b> .....	48

3.4.1 Dissoziation des Peptidase-Komplexes aufgrund unterschiedlicher Salzkonzentrationen.....	48
3.4.2 AP-B interagiert nicht mit NRDC in den Fraktionen der DEAE-Chromatographie.....	50
3.4.3 Die massenspektrometrische Analyse verifiziert NRDC in der Fraktion B12 der DEAE-Chromatographie und bestätigt die Dissoziation des Peptidase-Komplexes.....	51
3.4.4 Aufreinigung von AP-B und NRDC aus den Fraktionen der DEAE-Chromatographie.....	53
<b>3.5 Die <i>in vitro</i> AP-B-NRDC Komplex Rekonstitution führt zu einer Aktivitätssteigerung beider Enzyme.....</b>	<b>59</b>
3.5.1 Unterschiedliche Migration der Peptidasen AP-B und NRDC und des <i>in vitro</i> generierten Komplexes in der Nativ-Gelelektrophorese.....	59
3.5.2 Enzymatische Aktivierung von AP-B durch NRDC.....	61
3.5.3 Enzymatische Aktivierung von NRDC durch AP-B.....	63
3.5.4 Der <i>in vitro</i> rekonstituierte AP-B-NRDC-Komplex prozessiert effektiv das Prohormon Arg-Enkephalin.....	64
<b>3.6 Effiziente Prozessierung des HCMVpp65<sub>490-503</sub> (14mer) MHC-Klasse-I-Vorläuferpeptids durch den <i>in vitro</i> rekonstituierten Peptidase-Komplex.....</b>	<b>66</b>
3.6.1 Bildung der 9mer, 10mer und 11mer HCMVpp65-Peptide durch den AP-B-NRDC-Komplex.....	66
3.6.2 Verstärkte Bildung der 9mer HCMVpp65 <sub>495-503</sub> Epitope durch den AP-B-NRDC-Komplex.....	69
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Interaktion zytosolischer Peptidasen und deren Rolle bei der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation des HCMVpp65-Epitops.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2 Die <i>in vitro</i> Prozessierung des HCMVpp65-14mers durch den AP-B-NRDC-Komplex führt zur effizienten Epitop-Generierung.....</b>	<b>82</b>
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
Abkürzungsverzeichnis.....	103
Publikationen.....	105
Danksagung.....	106
Eidesstattliche Erklärung.....	108

## Zusammenfassung

Die durch das MHC-Klasse-I-System präsentierten Antigene werden über den Abbau von poly-ubiquitinierten Proteinen bzw. defekten ribosomalen Produkten (DRiPs) generiert. Diesen Abbau übernimmt das 26S Proteasom, eine multikatalytische Protease im Zytosol, die essentiell ist für die Erzeugung von Peptiden mit Längen von 8 bis 25 Aminosäuren. Im Anschluss wird ein geringer Teil der N-terminal verlängerten Peptide post-proteasomal zu Epitopen von 8-10 Aminosäuren Länge *getrimmt*. Die finalen Epitope werden im ER an die MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden und nach dem Transport an die Zelloberfläche den spezifischen zytotoxischen T-Zellen des adaptiven Immunsystems präsentiert. Die post-proteasomale Prozessierung durch zytosolische Exo- und Endopeptidasen führt jedoch hauptsächlich zur Epitop-Zerstörung und nur ein sehr geringer Anteil der Peptide entkommt der Degradation. Bisher ist noch unklar, wie die enzymatischen Aktivitäten des heterogenen Peptidase-Pools im Zytosol die finale Epitop-Prozessierung beeinflussen. Eine Interaktion zu heteromeren Enzymkomplexen, wie bereits für zwei ER-residente Aminopeptidasen gezeigt wurde, könnte zur Modulation der spezifischen Peptidase-Aktivitäten im Zytosol führen und die Epitop-Prozessierung und -Präsentation verändern.

In der hier vorliegenden Arbeit durchgeführte Glycerolgradientenzentrifugationen und Immunpräzipitationsexperimente weisen darauf hin, dass die zytosolischen Peptidasen Nardilysin (NRDc) und Aminopeptidase-B (AP-B) in den gleichen Fraktionen sedimentieren und zu heteromeren Komplexen interagieren. Die siRNA-abhängige Reduktion der Proteinexpression der beiden Peptidasen hatte einen positiven Effekt auf die HCMVpp65-spezifische CTL-Antwort. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der Peptidase-Komplex die HCMVpp65 Epitop-Präsentation auf der Zelloberfläche vermindert. Die Aufreinigung der Peptidasen mit anschließender *in vitro* Komplex-Rekonstitution offenbarte eine erhöhte enzymatische Aktivität beider Interaktionspartner. Der Peptidase-Komplex prozessierte *in vitro* verstärkt die spezifischen fluorogenen Peptidsubstrate für AP-B und NRDc und das AP-B-spezifische Neuropeptid Arg-Enkephalin. Hingegen wies besonders AP-B allein eine geringe enzymatische Aktivität auf. Im scheinbaren Gegensatz zu dem Befund des CTL-Assays bewirkte der *in vitro* rekonstituierte Peptidase-Komplex jedoch die verstärkte Generierung des HCMVpp65 Epitops aus einem proteasomal generierten Vorläuferpeptid und nicht, wie erwartet, den weiteren Epitop-Abbau. Andererseits bewerkstelligte aufgereinigte AP-B allein die fortwährende Destruktion des Epitops. Die durchgeführte siRNA-abhängige Reduktion der Proteinexpression von AP-B und NRDc bewirkte jedoch ebenfalls eine Zunahme des transient transfizierten

pp65 Peptids. Dies deutet darauf hin, dass der Peptidase-Komplex auch unabhängig vom Abbau proteasomal generierter Vorläuferpeptide, vermutlich durch die Reduktion der pp65 Peptidsynthese und der entsprechenden DRiPs im Zytosol, die verminderte MHC-Klasse-I-Epitop-Präsentation bewirken kann. Die erzielten Erkenntnisse machen deutlich, dass die Interaktion von zytosolischen Peptidasen regulierend auf die Präsentation des HCMVpp65 Epitops wirkt und damit die HCMV-spezifische antivirale Immunantwort beeinflusst.



# 1 Einleitung

## 1.1 Peptidasen und Proteasen

Um die Proteinhomöostase in einem Organismus aufrecht zu erhalten, ist nicht nur die Synthese von Proteinen erforderlich, sondern auch der kontrollierte Abbau gealterter oder nicht-funktionstüchtiger Proteine. Die Spaltung der Peptidbindungen innerhalb von Peptiden oder Proteinen findet durch Hydrolyse statt, weshalb die Hydrolasen auch als Peptidasen oder Proteasen bezeichnet werden. Peptidasen kommen in allen Organismen einschließlich Viren, Bakterien und Eukaryonten vor. In Eukaryonten sind die Peptidasen in allen Kompartimenten vertreten, wie z.B. im Zytosol, in den Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), in Lysosomen und auch als extrazellulär sezernierte Formen. Zusätzlich zur fundamentalen Rolle im Abbau und Katabolismus von Proteinen haben sich die Peptidasen bzw. Proteasen evolutionär zur Ausführung komplexer regulatorischer Mechanismen weiterentwickelt (Neurath, 1984). Das entscheidende Wirkprinzip stellt dabei die selektive und limitierte Hydrolyse von spezifischen Peptidbindungen innerhalb verschiedener Abschnitte bestimmter Substrate dar. Hierdurch wird z.B. der kontrollierte Abbau von zytosolischen und von Kern-lokalisierten Proteinen (Ciechanover, 1994), die Regulation des Blutdrucks (Davie et al, 1991), die Zellzykluskontrolle (Taylor, 1993a), die Prohormon und Propeptid-Prozessierung (Hook et al, 2004), die Steuerung der Apoptose (Cohen, 1997) und die Prozessierung von Antigenen für die Immunantwort (Kloetzel, 2004) vermittelt. Eine essentielle Protease ist z.B. das Proteasom, ein multikatalytischer Proteasekomplex, der neben der allgemeinen Protein-Homöostase der Zelle entscheidend an der Prozessierung von zytosolischen Proteinen für die *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-I-Antigenpräsentation beteiligt ist (Kloetzel, 2004). Weitere Peptidasen im Zytosol und ER sind für den vollständigen Abbau der proteasomal generierten Peptidfragmente zuständig oder tragen zur Generierung von spezifischen MHC-Klasse-I-Antigenen bei, wodurch sie ebenfalls entscheidend an der Regulation der Antigenpräsentation und der adaptiven Immunabwehr beteiligt sind (Kessler et al, 2011; Reits et al, 2003; Towne et al, 2007).

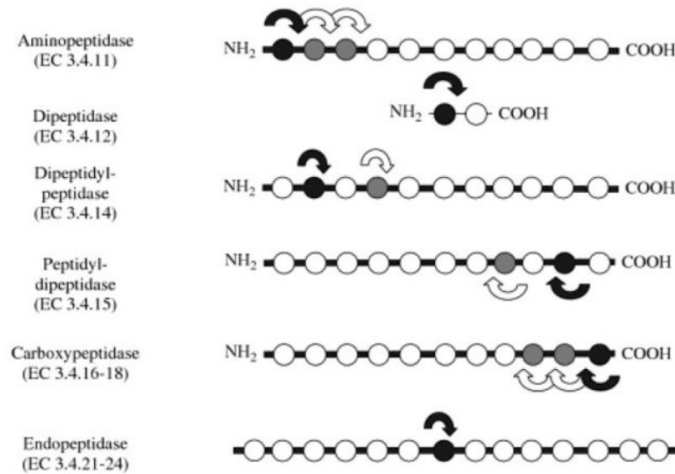
Aufgrund des gleichen Wirkprinzips von Peptidasen und Proteasen bei der Spaltung von Peptidbindungen, werden sie im Folgenden als gleichwertig behandelt.

### 1.1.1 Klassifizierung der Peptidasen

Es existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Peptidasen. 2% aller proteinkodierenden Gene kodieren für Peptidasen (Rawlings & Barrett, 1999). Um die zeitlichen und örtlichen Peptidase-Aktivitäten innerhalb eines Organismus zu regulieren, werden annähernd alle Peptidasen als inaktive Vorstufen, sogenannte Zymogene, synthetisiert. Erst wenn das Zymogen seinen Wirkungsort erreicht hat, kommt es zur Aktivierung durch die limitierte Proteolyse eines inhibierenden Pro-Enzymsegmentes, wie z.B. bei Verdauungsenzymen (Neurath, 1984; Neurath, 1989). Zymogen-Aktivierungen können auch durch sogenannte Kaskaden vermittelt werden, wobei es zu proteolytischen Aktivierungen von Proteasen kommt, die wiederum das Zymogen durch Spaltung aktivieren. Dies ist z.B. bei der Blutgerinnung entscheidend, wodurch eine schnelle und wirksame Antwort auf Verletzungen gewährleistet wird. Einige Proteinhormone werden als inaktive Vorstufen bereitgestellt. So entstehen z.B. aus dem Pro-Glukagon gewebeabhängig durch proteolytische Prozessierungen verschiedene Peptidhormone, u.a. das Glukagon. Das Peptidhormon Glukagon kann wiederum durch das sequentielle Zusammenwirken von Endo- und Exopeptidasen in das Miniglukagon prozessiert werden, welches eine antagonistische Wirkungsweise zum Glukagon aufweist und z.B. die lokale Insulinfreisetzung inhibiert (Fontes et al, 2005).

Durch die Zuordnung von unterschiedlichen Peptidasen zu den Endo- und Exopeptidasen findet gleichzeitig eine erste Kategorisierung bezüglich der Angriffspunkte im Substrat statt. Endopeptidasen hydrolysieren interne Peptidbindungen in einer Polypeptidkette. Sie werden gemäß der Struktur des katalytischen Zentrums in die Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metallopeptidasen unterteilt. Exopeptidasen hydrolysieren Peptidbindungen, die nicht weiter als drei Aminosäuren von den Peptidenden entfernt sind und benötigen dafür eine freie N-terminale Aminogruppe und/oder C-terminale Carboxygruppe. Sie lassen sich weiter in die Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen, Dipeptidyl-Peptidasen, Peptidyl-Peptidasen, Tripeptidyl-Peptidasen und Dipeptidasen unterteilen (**Abb.1.1**). Die Aminopeptidasen werden nach der vorrangig gespaltenen N-terminalen Aminosäure bezeichnet. Zum Beispiel spaltet die Leucyl-Aminopeptidase (LAP) bevorzugt Leucin vom Aminoterminus ab. Nach diesem System werden die Arginyl-, Methionyl-, Aspartyl-, Alanin-, Glutamyl-, Prolyl- und Cystenyl-Aminopeptidasen beschrieben (Rawlings & Barrett, 1993). Aminopeptidasen sind essentiell

für den intrazellulären Peptidabbau sowie mit der Zell- Zyklus- Kontrolle (Taylor, 1993a; Taylor, 1993b) und der Hormonprozessierung assoziiert (Pham et al, 2007).



**Abb. 1.1 Klassifikation von Peptidasen anhand der katalysierten Enzymreaktion.**

Peptide sind als Kreise an einer Linie dargestellt, wobei jeder Kreis eine Aminosäure und die Linie die Peptidbindung repräsentiert. N (NH<sub>2</sub>)- und C (COOH)-Termini sind jeweils gekennzeichnet. Die schwarzen Pfeile deuten auf den ersten Enzymschnittpunkt hin und die weißen Pfeile auf die folgenden Schnittpunkte. Die schwarzen Kreise stellen die Aminosäuren dar, die für den ersten Schnitt innerhalb der Peptidkette relevant sind und die grauen Kreise stehen für die Aminosäuren, die in den folgenden Schnitten entfernt werden (Rawlings & Barrett, 1993).

Die vielfältigen Exo- und Endopeptidasen werden aufgrund der unterschiedlichen Strukturen in den katalytischen Zentren in die Metallo-, Serin-, Cystein und Aspartatpeptidasen eingeteilt. Eine große Anzahl von Peptidasen wird den Metallopeptidasen zugeordnet (Rawlings & Barrett, 1993). Die Metallopeptidasen beinhalten ein gebundenes zweiwertiges Metallion, meist Zink, mitunter auch Cobalt oder Mangan, im katalytischen Zentrum (Rawlings & Barrett, 1993). Die Metallopeptidasen mit einem Zinkion im katalytischen Zentrum, sogenannte Zinkine, werden weiter unterteilt in Gluzincine und in Metzincine (Hooper, 1994). Die Mitglieder der Gluzincine beinhalten das kurze HEXXH-Motiv und binden Zink über zwei Histidin-Reste und einen Glutaminsäure-Rest, der abseits des Zn-Bindungs-Motivs liegt. Zu dieser Familie gehört z.B. die Endopeptidase Thimet Oligopeptidase (TOP). Des Weiteren sind verschiedene Aminopeptidasen den Gluzincinen zuzuordnen, wie z.B. die zytosolisch lokalisierten Peptidasen Aminopeptidase B (AP-B), Puromycin Sensitivie Aminopeptidase (PSA) und die ER-residenten Aminopeptidasen ERAPI und ERAPII, welche alle

zur Familie M1 der Metallopeptidasen gehören (Hattori & Tsujimoto, 2004; Taylor, 1993a; Taylor, 1993b). Die Leucin Aminopeptidase (LAP) wird darüber hinaus in die Familie M17 der Metallopeptidasen eingeordnet. Die vielzähligen Metallopeptidasen sind an unterschiedlichen biologischen Prozessen, wie z.B. der Entwicklung, Prozessierung von Peptidhormonen, Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, Zell-Zell-Fusion, Zell-Adhäsion und Migration und Nährstoffabsorption, beteiligt (Nagase, 2001). Die Matrix Metalloproteasen (MMP), die zu den Metzincinen gehören, sind für den Abbau extrazellulärer Matrixkomponenten, wie z.B. Kollagen, Proteoglykan und Glykoproteine, verantwortlich (Nagase & Woessner, 1999). Zu ihnen zählen ebenfalls die ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*)-Metalloproteasen.

Serinpeptidasen zeichnen sich durch eine Serin, Histidin und Asparagin-Triade im katalytischen Zentrum aus (Rawlings & Barrett, 1993). Sie sind z.B. an der Pro-Protein und Neuropeptid Prozessierung (Garcia-Horsman et al, 2007), dem Nahrungsverdau und der Blutgerinnung beteiligt (Page & Di Cera, 2008). Zu den Serinpeptidasen gehören ebenfalls die Granzyme, die die direkte Apoptose vermittelt über Natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen innerhalb der Immunantwort einleiten (Barry & Bleackley, 2002). Cysteinpeptidasen, wie z.B. die Bleomycin Hydrolase (BH), beinhalten die katalytisch aktiven Aminosäuren Cystein, Histidin und Asparagin im katalytischen Zentrum (Kamphuis et al, 1985). Zu ihnen zählen u.a. auch lysosomale Peptidasen wie die Cathepsine.

Da gezeigt werden konnte, dass verschiedene Exo- und Endopeptidasen eine Rolle innerhalb des MHC-Klasse-I-Präsentationsweges aufweisen (Kessler et al, 2011; Kloetzel, 2004; Reits et al, 2003; Towne et al, 2007), werden in den folgenden Abschnitten der Mechanismus der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation und die Funktionen der entsprechenden Peptidasen vorgestellt.

## 1.2 Der MHC-Klasse-I-Antigen-Präsentationsweg

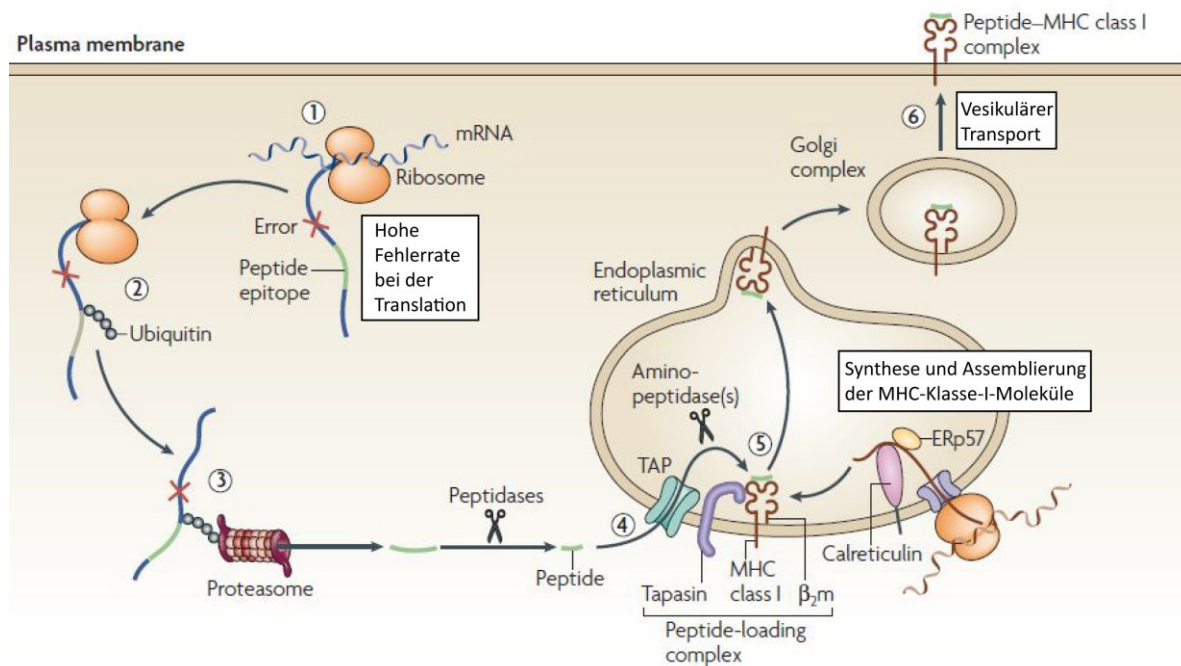
Auf der Oberfläche von kernhaltigen Zellen höher entwickelter Organismen werden MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC, *major histocompatibility complex*, im humanen System als HLA - *human leukocyte antigen* bezeichnet) exprimiert. Die MHC-Moleküle translozieren zwischen der Zelloberfläche und dem ER und werden innerhalb der Zelle mit spezifisch prozessierten Peptiden beladen. Nach der Translokation an die Zelloberfläche kann der Peptid-MHC-Komplex durch spezifische T-Lymphozyten erkannt werden. Eine wichtige Quelle für solche MHC-Klasse-I-Liganden stellen neusynthetisierte, fehlgefaltete Proteine dar, die sogenannten defekten ribosomalen Produkte (*defective ribosomal products*- DRiPs) (Reits et al, 2000; Schubert et al, 2000; Yewdell, 2005). Die DRiPs können innerhalb weniger Minuten durch das sogenannte Ubiquitin Proteasom System (UPS) abgebaut werden (Schubert et al, 2000). Die schnelle Degradation der DRiPs ermöglicht wiederum dem Immunsystem zeitnah auf Infektionen zu reagieren, da längere Halbwertszeiten von intakten Proteinen, wie z.B. 1-2 Tage oder mehrere Wochen, auf diesem Weg umgangen werden können. Das UPS stellt in höheren Eukaryonten eine essentielle Protease bei der Prozessierung von MHC-Klasse-I-Antigenen dar (Glickman et al, 1998; Kloetzel, 2001; Rock et al, 2002). Der Enzymkomplex, der für den Abbau zytosolischer Proteine verantwortlich ist, ist das 26S Proteasom. Das 26S Proteasom baut die poly-ubiquitinierten Substrate ATP-abhängig ab. Der 26S-Komplex wird aus dem proteolytisch aktiven 20S Kern und zwei regulatorischen 19S Partikeln gebildet, die für die Interaktion mit dem Substrat verantwortlich sind. Innerhalb eines Proteins kann das Proteasom nach fast jeder Aminosäure schneiden (Kisselev et al, 2003; Nussbaum et al, 1998), wobei gewisse Schnittpräferenzen für aktive Untereinheiten, wie z.B. bevorzugte Schnitte nach hydrophoben und basischen Aminosäureresten gezeigt werden konnten (Stoltze et al, 1998). Während der Infektion wird u.a. durch aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (CTLs) und natürliche Killerzellen (NKs) das immunmodulatorische Zytokin Interferon- $\gamma$  freigesetzt. Interferon- $\gamma$  führt vorrangig zur Veränderung der quantitativen proteasomalen Aktivität (Toes et al, 2001) durch die Synthese neuer Proteasomen Komplexe mittels des induzierten Einbaus der drei Immununtereinheiten  $\beta$ 1i (LMP2),  $\beta$ 2i (LMP7) und  $\beta$ 5i (MECL) in das 20S Proteasom bei gleichzeitigem Austausch der konstitutiven Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 (Kloetzel, 2001; York et al, 1999). Kürzlich publizierte Daten zeigen, dass das sogenannte Immunoproteasom durch den effizienten Abbau von DRiPs für die ge-

nerelle Protein-Homöostase der Zelle wichtig ist, wobei dieser Effekt auch die Grundlage für die vermehrte Produktion von MHC-Klasse-I-Liganden unter Entzündungs- und Infektionsbedingungen bildet (Seifert et al, 2010). Interferon- $\gamma$  reguliert zudem die Expression des Proteasom-Aktivatorkomplexes PA28, der an die äußeren  $\alpha$ -Ringe des 20S Proteasoms binden kann und *in vitro* die proteolytische Aktivität verstärkt (Dubiel et al, 1992).

Es konnte gezeigt werden, dass das Proteasom vorwiegend C-terminale Schnitte durchführt und somit den C-terminalen Anker der MHC-Klasse-I-Epitope generiert (Kloetzel, 2001; Rock et al, 2004; Stoltze et al, 1998). Die proteasomal generierten Peptide weisen jedoch Längen von 3 bis 30 Aminosäuren auf (Kisselev et al, 1999). Demnach wird die Mehrzahl der MHC-Klasse-I-Liganden vorwiegend als N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide, sogenannte Epitop-Vorläufer, generiert. Dies bedeutet, dass ein weiteres Schneiden am N-Terminus (*Trimmen*) der Peptide notwendig ist, um eine finale Epitop-Länge von 8-10 Aminosäuren zu erzielen (Kloetzel & Ossendorp, 2004). Durch zytosolische Peptidasen kommt es jedoch überwiegend zum vollständigen Abbau von proteasomal generierten Vorläuferpeptiden in einzelne Aminosäuren, die innerhalb der Proteinbiosynthese wiederverwertet werden können (Reits et al, 2003). Die Epitop-Generierung durch zytosolische Peptidasen konnte anhand einiger spezifischer Beispiele gezeigt werden (Kessler et al, 2011; Rammensee et al, 1995). Dennoch entkommen nur schätzungsweise ein Prozent der Peptide dem vollständigen proteolytischen Abbau innerhalb des Zytosols (Reits et al, 2003). Diese Peptide werden in einem nächsten Schritt über den TAP-Transporter (TAP, *transporter associated with antigen processing*), einem heterodimeren Mitglied der ABC-Familie von Transportern (ABC, *ATP-binding cassette*), in das ER transloziert (Androlewicz et al, 1993; Kleijmeer et al, 1992). Innerhalb des ER kann eine weitere Prozessierung und Epitop-Generierung durch ER-residente Aminopeptidasen stattfinden (Saveanu et al, 2005). Entgegen der formulierten Annahme, dass die finale Epitop-Generierung ausschliesslich im ER stattfindet, konnten Hearn et al. mittels transient transfizierter Vorläuferpeptide mit N-terminal variierenden Sequenzen zeigen, dass das *Trimmen* prinzipiell in beiden Kompartimenten, Zytosol und ER, stattfinden kann. Die Effizienz beim *Trimmen* ist dabei von der spezifischen N-terminalen Sequenzverlängerung abhängig und es bestehen unterschiedliche Sequenzspezifitäten beim zytosolischen *Trimmen* und dem *Trimmen* im ER (Hearn et al, 2010). Damit dient das Schneiden von Vorläuferpeptiden in beiden Kompartimenten der Erweiterung des Repertoires präsentierter Epitope, da Peptide mit unterschiedlichen Längen und Sequenzen gene-

riert werden können. Einen weiteren wichtigen Hinweis auf die Beteiligung zytosolischer Peptidasen an der Epitop-Generierung liefern Studien anhand von isolierten Mikrosomen. Diese zeigen, dass ER-luminale Peptide aus der ER-Membran heraus retrotransloziert werden können und TAP-abhängig wieder zurück in das ER recycelt werden (Roelse et al, 1994). Dieser Recycling-Mechanismus von Peptiden zwischen dem ER und dem Zytosol ist z.B. beim unvollständigen *Trimmen* durch Peptidasen im ER notwendig (Hearn et al, 2010).

Anschliessend werden die finalen Epitope an MHC-Klasse-I-Moleküle zur Zelloberflächenpräsentation gebunden. Die Bindung der Epitope an MHC-Klasse-I-Moleküle wird dabei durch den *peptide-loading-complex* (PLC) vermittelt, der prinzipiell aus den Untereinheiten des TAP-Transporters, den Chaperonen Tapasin und Calreticulin (CRT), der Disulfid-Isomerase ERp57 und dem MHC-Molekül gebildet wird (Ortmann et al, 1994). Das MHC-Klasse-I-Molekül selbst beinhaltet eine Peptidbindungstasche, die durch sogenannte  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen gebildet wird und sich durch polymorphe Strukturen auszeichnet (Jones, 1997). Innerhalb der Peptidbindungstasche können Peptide mit den Amino- und Carboxy-Termini sowie einem Teil der Aminosäureseitenketten in Haplo-Typ spezifische Furchen binden (Rammensee et al, 1995). Auf diesem Weg wird eine extrem stabile und hoch affine Interaktion gewährleistet. Der größte Anteil der C-terminalen Ankerreste der Peptide zeichnet sich durch hydrophobe und basische Aminosäuren aus und stimmt damit mit den Schnittpräferenzen vom Proteasom (Kloetzel, 2004) und der Präferenz des TAP-Transporters bei der Translokation von Peptiden überein (Momburg et al, 1994). Schließlich erfolgt der vesikuläre Transport des Peptid-MHC-Komplexes über das Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche. Dort kann der T-Zell-Rezeptor (TZR) spezifischer CTLs durch Bindung an exponierte Oberflächen vom Peptid und zugänglichen Teilen des MHC-Moleküls den Peptid-MHC-Komplex erkennen (Garcia et al, 1996) (**Abb.1.3**).



**Abb.1.2 Die MHC-Klasse-I-Antigen-Präsentation.**

Eine Quelle von MHC-Klasse-I Liganden stellen DRiPs dar (1), die zur Degradation polyubiquitiniert werden (2). Sie werden durch das 26S Proteasom zu Peptiden degradiert, die durch verschiedene zytosolische Peptidasen weiter prozessiert werden können (3). Über den TAP-Transporter werden die Peptide in das ER transloziert. Hier werden sie durch die ER-residenten Aminopeptidasen weiter prozessiert (4) und im *peptide loading complex* (PLC) auf naszierende MHC-Klasse-I-Moleküle geladen (5). Der Transport der MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe zur Zelloberfläche erfolgt über das Golgi-Netzwerk (6). Abb. abgeändert nach Vyas et al. (Vyas et al, 2008)

### 1.2.1 Prozessierung von Vorläuferpeptiden durch zytosolische Peptidasen

Zytosolische Peptidasen sind überwiegend für den Abbau der proteasomal freigesetzten Vorläuferpeptide verantwortlich. Nur ein Prozent der generierten Vorläuferpeptide werden durch Peptidasen zu adäquaten Epitop-Längen *getrimmt* (Reits et al, 2003). Bisher ist nicht geklärt, inwiefern ein Zusammenwirken der zytosolischen Peptidasen bei der Prozessierung von MHC-Klasse-I-Vorläuferpeptiden erfolgt und ob es sich dabei um die Bildung von Peptidase-Komplexen, bzw. Interaktionen von Peptidasen handelt oder um sequentielle Enzymaktivitäten.



Verschiedene Beispiele haben gezeigt, dass mehr als eine Peptidase an der Generierung einzelner Epitope beteiligt sein kann. So wurde z.B für die zytosolisch lokalisierten Peptidasen BH und LAP ein Zusammenwirken demonstriert. Der *knockout* beider Aminopeptidasen in der Maus führte zu einer kaum veränderten MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation mit Ausnahme einer erhöhten CTL-Reaktion gegen das lymphozytische Choriomeningitis-Virus (LCMV) Epitop-gp276 (Towne et al, 2007). Für BH allein konnte in vorausgehenden Studien *in vitro* ein spezifischer Effekt auf die Epitop-Generierung von vesikulären Stomatitis Virus (VSV)-Epitopen gezeigt werden (Stoltze et al, 2000). Im Gegensatz dazu wurde jeweils in BH-defizienten und in LAP-defizienten Mäusen kein Einfluss auf die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation von verschiedenen spezifischen viralen Epitopen demonstriert (Towne et al, 2005). Die physiologische Rolle von BH ist bislang unklar. Dennoch wurde die Peptidase mit der Alzheimer Erkrankung in Verbindung gebracht (Lefterov et al, 2000). In einem anderen Beispiel der Generierung des RU-1<sub>134-142</sub> Tumor Epitopes, konnte das gemeinsame N-terminale *Trimmen* der zytosolischen Peptidasen PSA und Tripeptidyl Peptidase II (TPP II) beschrieben werden. Die beiden Peptidasen führten *in vitro* entweder die gleichen Schnitte redundant durch oder arbeiteten sequentiell zusammen, abhängig von Länge und Sequenz der N-terminalen Verlängerung des proteasomal freigesetzten Vorläuferpeptids (Levy et al, 2002). Wider Erwarten zeigten jedoch PSA-*knockout*-Mäuse keine erhebliche Veränderung der MHC-Klasse-I-Antigen-Präsentation (Towne et al, 2008). TPPII ist ein außergewöhnlich großer Serinprotease-Komplex mit einer Masse von ~6 MDa, der aus 40 identischen Untereinheiten mit Molekulargewichten von 140 kDa konstituiert wird (Rockel et al, 2002). Mit einer Exopeptidase-Aktivität entfernt TPPII N-terminal Tri-Peptide von Peptiden mit Längen größer als 15 Aminosäuren (Reits et al, 2004; Tomkinson & Lindas, 2005). TPPII ist neben dem N-terminalen *Trimmen* von Vorläuferpeptiden fähig den korrekten C-Terminus eines spezifischen HIV-Epitops (Seifert et al, 2003) und eines Influenza Virus Epitops (Guil et al, 2006) zu generieren (Reits et al, 2004). Zusammengefasst wurde in TPP II-defizienten Mäusen eine überwiegend destruktive Aktivität der Aminopeptidase in der MHC-Klasse-I-Peptid-Prozessierung beschrieben (Firat et al, 2007a). Neben der Funktion in der Antigenprozessierung ist TPPII an der Steuerung von Apoptose und Zellwachstum beteiligt (Stavropoulou et al, 2006).

### **Thimet Oligopeptidase (TOP)**

Für die Metallo-Endopeptidasen TOP und Nardilysin (NRDc) wurde kürzlich beschrieben, dass beide Peptidasen zusammen durch sequentielle Enzymaktivitäten an der Generierung des PRAME-Tumor-Epitops beteiligt sind (Kessler et al, 2011). Dies steht im Gegensatz zu vorausgehenden Analysen, in denen TOP für den Abbau von MHC-Klasse-I-Peptiden mit einer Länge von 6-17 Aminosäuren im Zytosol verantwortlich gemacht wird und hauptsächlich einen limitierenden Faktor bei der MHC-Klasse-I-Antigen-Präsentation darstellt (Rock et al, 2004; Saric et al, 2001; York et al, 2003). Bisher wurde TOP als eine monomere, 78 kDa große Peptidase beschrieben, die weit verbreitet in allen Zellen und Geweben mit einer erhöhten Expression in Gehirn und Testis vorkommt (Pineau et al, 1999). Im zentralen Nervensystem ist die sekretierte Form von TOP für den Abbau und die Prozessierung von Neuropeptiden und Substraten wie Neurotensin und Bradykinin zuständig (Wu et al, 1997). Lew et al. konnten zeigen, dass TOP zusammen mit der Prolyl Oligopeptidase (POP) sequentiell das Peptidhormon GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormon*) prozessiert (Lew et al, 1994). Die Kristallstruktur von TOP weist auf verschiedene Cystein-Reste hin, die eine intermolekulare Oligomerisierung und die Bildung von Multimeren bewirken können (Ray et al, 2004).

### **Prolyl Oligopeptidase (POP)**

Die ubiquitär vorkommende Serin-Endopeptidase POP weist ein Molekulargewicht von 81 kDa auf und schneidet C-terminal eines Prolinrestes in Peptiden, die kleiner als 30 Aminosäuren sind (Polgar, 1994). POP ist an dem Abbau von Gluten beteiligt und kann auf diesem Weg einer Autoimmunreaktion in der Zöliakie entgegenwirken (Marti et al, 2005). Zudem ist POP an der Maturierung und dem Abbau von Peptidhormonen und Neuropeptiden wie Substanz P und Angiotensin beteiligt (Cunningham & O'Connor, 1997). Neuere Befunde von Urban et al. zeigten, dass POP eine negative Rolle in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation, vermutlich durch den Abbau von proteasomal generierten Vorläuferpeptiden, spielt (Urban et al, 2012).

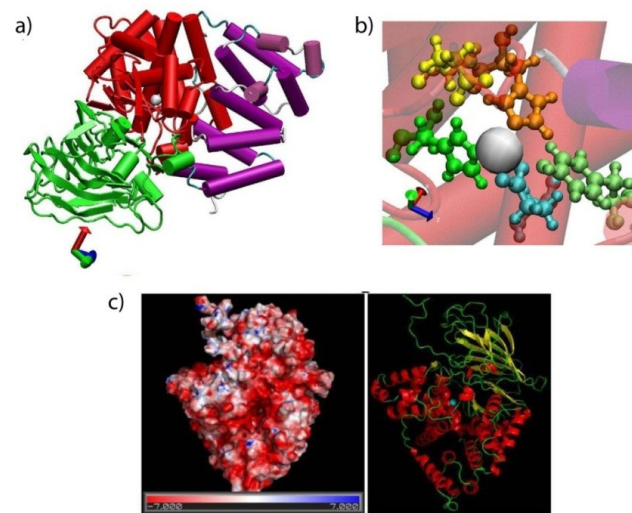
### **Nardilysin (NRDc)**

Die Metallopeptidase Nardilysin oder *N-Arginine dibasic convertase* (NRDc) wird als ein Inverzincin klassifiziert, da ein invertiertes Zink-Bindungsmotiv (HXXEH) im katalytischen Zentrum vorliegt (Ma et al, 2002; Pierotti et al, 1994). Das 140 kDa große NRDc ist ein Mitglied der M16-Familie von Metallopeptidasen und wird in vielen verschiedenen Geweben, vorrangig in Gehirn und Testis, exprimiert (Chesneau et al, 1994a). Neben der hauptsächlich zytosolischen Lokalisation wurde NRDc in Zellkompartimenten wie dem Zellkern (Ma et al, 2005) und in sekretorischen Vesikeln (Hospital et al, 2000) identifiziert. NRDc schneidet Peptidsubstrate N-terminal von einzelnen oder di-basischen Aminosäuren mit endoproteolytischer Aktivität (Chesneau et al, 1996; Chow et al, 2003). Weiterhin wurde neben NRDc die Isoform NRDc-2 beschrieben, die sich durch eine Insertion von 68 Aminosäuren N-terminal des katalytischen Zentrums von NRDc unterscheidet (Hospital et al, 1997). Bisher besteht Unklarheit über Expression, Lokalisation und Aktivität von NRDc-2. NRDc generiert zusammen mit TOP durch sequentielle Schnitte ein spezifisches Tumor-Epitop (Kessler et al, 2011). Weiterhin prozessiert NRDc in Zusammenarbeit mit AP-B *in vitro* das Prohormon Somatostatin-28 in Somatostatin-14, welches vom Pankreas endokrin während der Verdauung ausgeschüttet wird (Foulon et al, 1997; Gluschankof et al, 1987). *In vivo* konnte eine sequentielle Aktivität von AP-B und NRDc für das Schneiden des Peptidhormons Glukagon in Mini-Glukagon gezeigt werden (Fontes et al, 2005). Damit deutet dieses Zusammenwirken von Endo- und Exopeptidasen auf einen wichtigen Mechanismus innerhalb der Prohormon-Prozessierung hin. Des Weiteren prozessiert NRDc weitere Prohormone wie Dynorphin A und Preproneurotensin (Chesneau et al, 1994a; Chesneau et al, 1994b). Das Dynorphin A wird als ein Opioidpeptid bei der Schmerzempfindung sekretiert und Neurotensin hemmt als Neuropeptid die Säuresekretion des Magens und stimuliert die Darmkontraktion. Zudem führt die Interaktion von NRDc mit ADAM-Metalloproteasen zur Verstärkung von  $\alpha$ -Sekretase-Aktivitäten, wodurch es zu einer Verminderung von produziertem Amyloid- $\beta$ -Peptid kommt (Hiraoka et al, 2007). Das Amyloid- $\beta$ -Peptid ist in großen Mengen wahrscheinlich für die Alzheimer-Erkrankung verantwortlich. Verschiedene Mitglieder der Familie von ADAM-Metalloproteasen, wie ADAM9, ADAM10 und ADAM17/*tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) converting enzyme* (TACE) weisen eine solche  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität auf (Allinson et al, 2003; Buxbaum et al, 1998; Hooper & Turner, 2002; Koike et al, 1999; Lammich et al, 1999). Die Ko-Expression von NRDc mit den verschiedenen

ADAM-Proteasen führt zur Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität und zur Reduktion von transfizierendem Amyloid- $\beta$ -Peptid (Hiraoka et al, 2007). Darüber hinaus konnte *in vitro* sowohl die direkte Assoziation von NRDC mit ADAM17/TACE, als auch die durch diese Protein-Protein-Interaktion verstärkte ADAM/TACE-Aktivität, nachgewiesen werden (Nishi et al, 2006). Es wurde außerdem demonstriert, dass eine saure Interaktionsdomäne von NRDC, bestehend aus 43 (humanes NRDC) bis 59 (Maus NRDC) Glutamat- und Aspartat-Aminosäuren, zwischen dem N-Terminus und dem aktiven Zink-Bindungsmotiv für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist (Hospital & Prat, 2004; Seidah & Prat, 2002; Stricker et al, 2006). Die Interaktion über die Bindungsdomäne führt zur Aktivierung des Bindungspartners sowie von NRDC selbst. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass NRDC mit der mitochondrialen Malat Dehydrogenase (mMDH) interagiert (Chow et al, 2005). Dadurch kommt es zur Aktivierung von NRDC selbst und von dem Bindungspartner mMDH, der dadurch verstärkt mit der *Citrate Synthase* (CS) interagiert. Der Komplex bestehend aus mMDH und CS führt zu einer Steigerung des Zitronensäurezyklus und des zellulären Metabolismus (Morgunov & Srere, 1998). Eine andere Form der Aktivierung wurde für NRDC im Zusammenhang mit Polyaminen beschrieben. Durch die Beobachtung von Ma et al., dass Polyamine, wie z.B. Spermin, eine Translokation des NRDC-Polyamin-Komplexes vom Zytosol in den Zellkern bewirken können (*Nuclear Shuttling*) (Ma et al, 2004), wird deutlich, dass ein Teil des translatierten NRDC ein Kern-Lokalisationssignal beinhaltet. Das im Kern lokalisierte NRDC unterscheidet sich durch einen anderen Translationsstart von dem ausschliesslich zytosolisch vorkommenden NRDC. NRDC mit einer Kern-Lokalisationssequenz wird vom Methionin<sup>1</sup> als Translationsstart translatiert und das zytosolische NRDC mit fehlender Kern-Lokalisationssequenz vom Methionin<sup>49</sup> (Hospital et al, 2002). Die Polyamine vermitteln in diesem Zusammenhang die verstärkte Kern-Translokation von NRDC gemeinsam mit dem Bindungspartner, wie z.B. dem Spermin (Ma et al, 2004). Aktuelle Befunde zeigten zudem, dass NRDC innerhalb des Zellkerns die Regulation der Transkription durch die Bindung des di-methylierten Histons H3K4 und der Rekrutierung eines Repressor-Komplexes negativ beeinflussen kann (Li et al, 2012).

### Aminopeptidase B (AP-B)

AP-B ist eine 72 kDa große ubiquitär vorkommende Aminopeptidase, die selektiv Peptidbindungen C-terminal von den basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin am N-Terminus von Peptiden schneidet (Cadel et al, 1995). Neben der zytosolischen Lokalisation von AP-B wurden membranassoziierte und sekretierte Formen identifiziert (Belhacene et al, 1993). AP-B prozessiert in verschiedenen Geweben das Prohormon Arg-Enkephalin, das als Opioidpeptid im Rahmen der Stressantwort sekretiert wird und der akuten Schmerzunterdrückung dient (Hook et al, 2004). Weiterhin generiert AP-B zusammen mit der Endopeptidase NRDC aus dem Hormonvorläufer Glukagon den Botenstoff Miniglukagon (Fontes et al, 2005). Für AP-B wurde eine Funktion beim Abbau von MHC-Klasse-I-Peptiden vermutet, da die Aminopeptidase einen negativen Effekt auf die Präsentation eines spezifischen Epitops des humanen Zytomegalievirus (HCMV) in CTL-Assays zeigte (Urban et al, 2012). Die Aminopeptidase weist eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zu der Leukotrien A<sub>4</sub> Hydrolase (LTA<sub>4</sub>H) auf, die *in vivo* LTA<sub>4</sub> in den pro-inflammatorischen Lipid Mediator LTB<sub>4</sub> hydrolysiert und *in vitro* ebenfalls eine Aminopeptidase-Aktivität aufweist (Cadel et al, 1997). Ein AP-B Strukturmodell, ausgehend von der Aminosäuresequenz von rekombinanter AP-B der Ratte, zeigt Motive für Protein-Protein-Interaktionen (Pham et al, 2007) (**Abb. 1.2 a, b, c**). Beispielsweise besteht die C-terminale Domäne von AP-B aus  $\alpha$ -helikalen Strukturen mit Ähnlichkeiten zu Armadillo-Repeat- oder HEAT- (*Huntington-Elongation-A-subunit-TOR*) Motiven. Diese superhelikalen Strukturen können sich um Peptide in der umgekehrten Orientierung wickeln und eine Art doppel-helikale Peptidstruktur als Form einer starken Protein-Protein-Interaktion ausbilden (Andrade et al, 2001; Groves et al, 1999). Zusätzlich beinhaltet AP-B zwei Prolinreiche Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu SH3-Strukturdomänen. Diese sind leicht von außen zugänglich und können ebenso Protein-Interaktionsdomänen darstellen (Pham et al, 2007). Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie-Analysen zeigten, dass AP-B an die äußere Zytoplasma-Membran von Zellen binden kann (Balogh et al, 1998; Cadel et al, 1995). In weiteren Immunfluoreszenz-Analysen wurde die Ko-Lokalisation von AP-B und NRDC zusammen mit dem Substrat Glukagon in sekretorischen Vesikeln von Langerhans-Zellen demonstriert (Fontes et al, 2005).



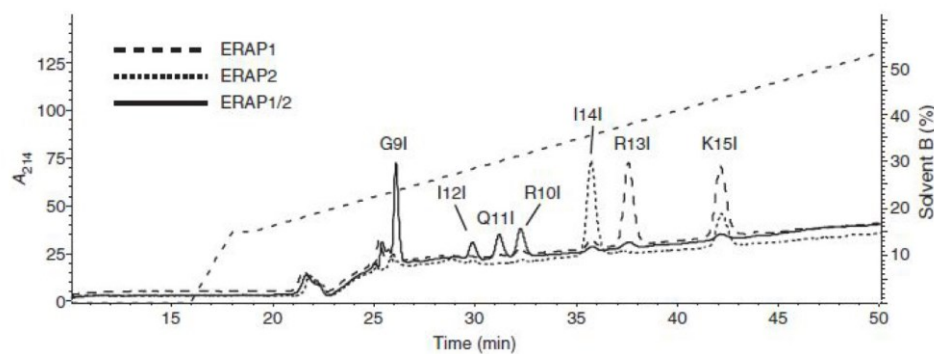
### 1.3 Modell der Struktur von AP-B aus der Ratte.

a) Struktur der Domänen von AP-B aus der Ratte. N-terminaler Sequenzabschnitt in grün, katalytische Domäne in rot und C-terminaler Abschnitt in violett. Das  $\text{Zn}^{2+}$  Atom ist als Kugel in grau dargestellt. b) Die Vergrößerung des katalytischen Zentrums zeigt die Nähe des Zink-Atoms (graue Kugel) zu den drei Zink-Liganden His<sub>324</sub> (orange), His<sub>329</sub> (grün), Glu<sub>348</sub> (blau) und zur katalytischen Aminosäure Glu<sub>325</sub> (gelb) sowie einem vermuteten Protonen-Donor der katalytischen Reaktion Tyr<sub>413</sub> (hellgrün). c) Verteilung des elektrostatischen Potentials des AP-B-Proteins. Die Skala für die Ladung reicht von sauer (rot) bis basisch (blau). Das elektrostatische Potential von AP-B ist hauptsächlich negativ, wobei der größte Teil der negativen Ladung im katalytischen Zentrum lokalisiert ist. Die Ladung der  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter ist überwiegend negativ und neutral/positiv. (Pham et al, 2007).

### 1.2.2 Prozessierung von Vorläuferpeptiden durch ER-residente Peptidasen

Nach dem TAP-abhängigen Transport in das ER-Lumen können die im ER-lokalisierten Aminopeptidasen, ERAPI (*ER associated aminopeptidase I*) und ERAPII, aus den transportierten Vorläuferpeptiden finale Epitope generieren (Saveanu et al, 2005). Es konnte demonstriert werden, dass in ERAAP- (*ER aminopeptidase associated with antigen processing*, dem Maus-Homolog zu ERAPI) defizienten Mäusen eine drastische Verminderung der Präsentation von L<sup>d</sup> MHC-Klasse-I-Molekülen, die Peptide mit einem X-Pro-Xn-Motiv binden können, stattfindet (Hammer et al, 2006). Zudem weisen ERAAP-defiziente Zellen eine verringerte Präsentation von zelleigenen und zellfremden Proteinen auf (Firat et al, 2007b; Serwold et al, 2002; Yan et al, 2006). Zusätzlich zu ERAPI wird die ER-Aminopeptidase-II (ERAII) in humanen Zellen, jedoch nicht in der Maus, exprimiert (Saveanu et al, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass ERAPI und ERAII zum Teil hete-

rodimere Komplexe ausbilden (Saveanu et al, 2005). Fraktionierungsanalysen der Aminopeptidasen des ER zeigten jedoch, dass der größte Anteil der Peptidasen einzeln vorliegt (Saveanu et al, 2005). Durch die *in vitro* Assoziation von rekombinant hergestelltem ERAPI und ERAPII kommt es zu einer alternativen, nicht-überlappenden Schnittpräferenz gegenüber den einzeln vorkommenden ER-Aminopeptidasen. Nur durch die heterodimere Assemblierung der rekombinanten Enzyme wird das spezifische HIV-Envelope-G9I-Epitop (HIV, humanes Immundefizienz-Virus) generiert (**Abb. 1.4**). Dieser Befund zeigt, dass die Interaktion von Peptidasen zur Modulation von spezifischen Enzymaktivitäten führen kann. Dies kann wiederum die spezifische Epitop-Generierung innerhalb der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation beeinflussen.



### 1.4 Kooperatives *Trimmen* des HIV-Envelope-G9I-Epitops.

Die Abbildung zeigt das HPLC-Spektrum der Produkte der Prozessierung des HIV-envelope-Epitops-G9I durch ERAPI und ERAPII. Die einzelnen rekombinanten Enzyme ERAPI und ERAPII und beide Enzyme zusammen wurden mit dem HIV-K15I-Epitopvorläufer 15 Minuten inkubiert. Die Prozessierungsprodukte wurden durch die Kationen-Austausch-Chromatographie getrennt. Nur die Kombination von ERAPI und ERAPII führt zur Generierung des HIV-G9I-Epitops (Saveanu et al, 2005).

## 1.3 HCMVpp65 als Modellantigen

Humane Zytomegalieviren (HCMV) werden der Familie der  $\beta$ -Herpesviridae zugeordnet, sind behüllt und besitzen ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom (Roizman et al, 1981).

Bei der Infektion mit dem HCM-Virus wird das 65 kDa Phosphoprotein pp65 (UL83) aus dem viralen Tegument in das Zytosol der Zelle überführt und steht somit der Antigenprozessierung direkt zur Verfügung. In einem weiteren Schritt wird das pp65-Protein in den Zellkern transportiert (Britt & Vugler, 1987; Dal Monte et al, 1996; Gallina et al, 1996; Sanchez et al, 1998; Schmolke et al, 1995), um dort die virale Genexpression zu beeinflussen und den lytischen Zyklus der HCMV-Infektion einzuleiten (Arcangeletti et al, 2011). Das pp65-Antigen stellt ein immundominantes Epitop dar, das zur Aktivierung der zellulären Immunantwort führt. Es konnte gezeigt werden, dass das pp65-Antigen bereits zwei Stunden nach der Infektion durch die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert wird (McLaughlin-Taylor et al, 1994) und kann trotz viraler Immunevasions-Mechanismen kontinuierlich nach fortwährender Infektion auf der Zelloberfläche detektiert werden (Besold et al, 2007). 70 bis 90% der gesamten CTL-Antwort wird durch pp65-spezifische CTLs vermittelt (Wills et al, 1996). Häufig sind die T-Zellen nur auf ein Epitop spezialisiert (Weekes et al, 1999), wie z.B. auf das immundominante HLA-A2-restringierte Epitop pp65<sub>495-503</sub> **NLVPMTATV**. Bisher konnte gezeigt werden, dass das immundominante Epitop des pp65-Proteins durch proteasomale Prozessierung generiert wird (Besold et al, 2007). Zudem werden verschiedene N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide, u.a. das 14mer (pp65<sub>490-503</sub>, **GILARNLVPMTATV**) gebildet (Urban et al, 2012). Neben der proteasomalen Prozessierung ist jedoch nur wenig über die Prozessierung durch zytosolische Peptidasen und deren Zusammenspiel bekannt. Das Verständnis der Zusammenarbeit einschließlich der Regulation dieser Peptidase-Aktivitäten ist jedoch Voraussetzung zur erfolgreichen Modifikation der antiviralen Immunantwort und damit auch entscheidend für die Konzeption neuer Vakzinierungsstrategien. Das HCM-Virus verursacht weltweit Infektionen. In gesunden Individuen wird die HCMV-Infektion normalerweise effizient durch die HCMV-spezifischen CTLs kontrolliert, wohingegen es jedoch bei immunologisch kompromittierten Individuen häufig zu schweren klinischen Krankheitsbildern kommt (Wills et al, 1996). Gegenwärtig steht keine wirksame aktive Immunisierung gegen die HCMV Infektion zur Verfügung. Die Aufklärung der zellulären Prozessierung des Phosphoproteins pp65 kann essentiell zur Konzeption von Therapien beitragen. Das HCMVpp65 Modellantigen diene in der hier vorliegenden Arbeit der Untersuchung enzymatischer Aktivitäten assoziierter zytosolischer Peptidasen und der Auswirkung auf die effiziente MHC-Klasse-I-Präsentation des HCMVpp65 Epitops.



## 1.4 Ziel der Arbeit

Zytosolische Peptidasen führen überwiegend zum Abbau proteasomal generierter Vorläuferpeptide und nur ein geringer Anteil entkommt der Degradation und kann als Epitop durch die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Für verschiedene zytosolische Peptidasen wurde eine Funktion in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation beschrieben. Bisher ist nicht geklärt, inwiefern ein Zusammenwirken der zytosolischen Peptidasen bei der Prozessierung von MHC-Klasse-I-Vorläuferpeptiden erfolgt und ob es sich dabei um die Bildung von Peptidase-Komplexen bzw. Interaktionen von Peptidasen handelt oder um sequentielle Enzymaktivitäten. Für die ER-residenten Amino-peptidasen ERAPI und ERAPII konnte gezeigt werden, dass sie teilweise heterodimere Enzymkomplexe bilden. Nur die Interaktion der ER-Amino-peptidasen führt zu alternativen enzymatischen Schnittpreferenzen und zu einer spezifischen HIV-Epitop-Generierung. Aufgrund dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, dass zytosolische Peptidasen mit einer Funktion in der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation miteinander interagieren können, wodurch die Enzymaktivitäten zur Prozessierung von spezifischen Vorläuferpeptiden moduliert werden.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Immunpräzipitationsexperimenten untersucht, ob die zytosolischen Peptidasen TOP, POP, AP-B, NRDC, BH, LAP, PSA und TPPII interagieren können. Durch die gleichzeitige siRNA-abhängige Reduktion der Proteinexpression der interagierenden Peptidasen wurde die Funktion des Peptidase-Komplexes bezüglich der MHC-Klasse-I-Epitop-Präsentation mittels HCMVpp65<sub>495-503</sub> spezifischer zytotoxischer T Lymphozyten analysiert. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Peptidasen aus HeLa-Zelllysaten aufgereinigt und eine *in vitro* Komplex-Rekonstitution des Peptidase-Komplexes durchgeführt. Mittels des *in vitro* rekonstituierten Komplexes konnte die Enzymaktivität der interagierenden Peptidasen anhand verschiedener Substrate untersucht werden. Schließlich wurden *in vitro* Prozessierungsexperimente mit dem HCMVpp65<sub>490-503</sub> Modellpeptid durchgeführt, um den Einfluss des Peptidase-Komplexes auf die Prozessierung dieses proteasomal generierten Vorläuferpeptids zu analysieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien/Verbrauchsmaterialien/Geräte

Allgemeine Chemikalien wurden in pro analysi Qualität von den Firmen AppliChem, J.T. Baker, VWR international (Merck), Roth, Serva, Sigma-Aldrich bestellt.

#### Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Plastikwaren wurden von der Firma Greiner, VWR, Falcon, Sarstedt und Biorad verwendet. Insbesondere wurden folgende Materialien verwendet:

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
10 / 15 cm Zellkulturschalen	Greiner
Kryoröhrchen	Sarstedt
Mikrotiterplatten 96F/ schwarz	Greiner
Protein-A Sepharose	GE Healthcare
Protein-G Sepharose	GE Healthcare
Immobilon-P PVDF Membran (0,45 µM)	Millipore
Röntgenfilme Xomat-UV/AR/Biomax-MR	Kodak
Bradford Protein Assay Dye	Bio-Rad

#### Inhibitoren:

Bestatin	Sigma
Arphaminin	Sigma
Phenanthroline	AppliChem

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank	Heraeus
FPLC-Äkta	Amersham
<u>FPLC Säulen:</u>	
HiTrap DEAE FF, 1ml	GE Healthcare
MonoQ 5/50 GL, 1ml	GE Healthcare
Superdex 200 10/300 GL, 24 ml	GE Healthcare
Kryobox	Nalgene
Spectrofluorimeter Synergy HAT mit Programmsoftware KC4	Bio Tec
Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham
Sterilbank Steril GARD Hood classII typ A/B3	The bakerCompany.Inc
<u>Zentrifugen:</u>	
Avanti J-E	Beckman Coulter
Centrifuge 5147R	Eppendorf
Ultracentrifuge Ultra Pro 80	Sorvall
Ultrazentrifuge Optima <sup>TM</sup> -L	Beckman Coulter
Rotor SW40	Beckman Coulter
Fraktionssammler (2112 Redirac Fraction Collector)	LKB, Bromma
Gradientenmischer	Syscomp
HPLC System Gold mit 32 Karat Software	Beckman Coulter

### 2.1.2 Zellkulturreagenzien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
BASAL ISCOVE's Medium	Biochrom AG
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
Puromycin	PAA Laboratories GmbH
Trypsin/EDTA	Gibco Invitrogen
OPTIMEM (Transfektion)	Gibco Invitrogen
RPMI1640	Biochrom AG
AB-Serum (human)	PromoCell

### 2.1.3 Substrate

<b>Methode</b>	<b>Substrat</b>	<b>Quelle</b>
<b>Immunoblot</b>	ECL Plus <i>Western Blotting Detection System</i>	GE Healthcare
<b>Aktivität</b>	H-Arg-AMC	Bachem
	Z-Gly-Pro-AMC	Bachem
	Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp)-OH	Bachem
	N-Succ-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Bachem
	Abz-GGFLRRVGQE-Tyr(NO <sub>2</sub> )-CONH <sub>2</sub>	AG Klotzel
	(Das NRDC-Substrat (Csuhai et al, 1999) wurde synthetisiert von der AG Dr. Henklein)	

## 2.1.4 Antikörper

<b>Methode</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Quelle</b>
<b>Western Blot</b>				
(primärer AK)	$\alpha$ APB	Kaninchen	1:40.000	AG Kloetzel
	$\alpha$ NRDc	Kaninchen	1:20.000	AG Kloetzel
	$\alpha$ TOP	Kaninchen	1:40.000	AG Kloetzel
	$\alpha$ POP	Kaninchen	1:20.000	AG Kloetzel
	$\alpha$ BH	Kaninchen	1:5.000	AG Kloetzel
	$\alpha$ PSA	Ziege	1:6.000	AG Kloetzel
	$\alpha$ LAP	Kaninchen	1:10.000	AG Kloetzel
	$\alpha$ TPPII	Kaninchen	1:1.000	AG Kloetzel
	$\alpha$ 6	Maus	1:1.000	AG Kloetzel
	$\alpha$ LTA <sub>4</sub> H	Kaninchen	1:1000	Abcam
	$\alpha$ Anti-c-myc	Maus	1:1000	Biomol
	$\alpha$ pp65	Maus	1:500	(Plachter et al., 1990)
	$\alpha$ GAPDH	Kaninchen	1:10.000	Santa Cruz
<b>Western Blot</b>				
(sekundärer AK)	$\alpha$ Kaninchen-HRP	Ziege	1:10.000	Dianova
	$\alpha$ Maus	Schaf	1:10.000	Seramun
<b>Immun-</b>				
<b>Präzipitation</b>	$\alpha$ APB	Kaninchen	1:16	AG Kloetzel
	$\alpha$ NRDc	Kaninchen	1:16	AG Kloetzel
	$\alpha$ Anti-c-myc	Maus	1:100	Biomol
<b>ELISA</b>	$\alpha$ rhIFN $\gamma$ mAk(1-D1K) Maus		1mg/ml	Mabtech
	$\alpha$ rhIFN $\gamma$ mAk(7-B6-1-Biotin) Maus		1mg/ml	Mabtech

## 2.1.5 Synthetische Peptide

Die folgenden Peptide wurden von der AG Dr. Henklein im Institut für Biochemie der Charité Berlin synthetisiert. Die Peptide wurden mit einer resultierenden Reinheit von 90% mit einer Standard-Fmoc-Methode und einem Applied Biosystems 433A automatisierten Synthesizer (Norwalk, CT) synthetisiert. Die bereitgestellten Peptide wurden für *in vitro* Verdauexperimente verwendet.

<b>Peptidlänge</b>	<b>Protein</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>
9mer	HCMVpp65 <sub>495-503</sub>	NLVPMVATV
10mer	HCMVpp65 <sub>494-503</sub>	R NLVPMVATV
11mer	HCMVpp65 <sub>493-503</sub>	AR NLVPMVATV
12mer	HCMVpp65 <sub>492-503</sub>	LAR NLVPMVATV
14mer	HCMVpp65 <sub>490-503</sub>	GILAR NLVPMVATV
4mer	Leu-Enkephalin	YGGFL
5mer	R-Leu-Enkephalin	R YGGFL

## Plasmide

Das Plasmid pcDNA-pp65.35 wurde von Prof. B. Plachter (Johannes Gutenberg Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Es kodiert für die vollständige Sequenz des Phosphoproteins 65 (pp65) von HCMV und wurde zur transienten Transfektion von HeLa A<sup>2+</sup> Zellen verwendet. Das pcDNA3.1-TOP-myc Expressionsplasmid wurde in der AG Kloetzel generiert und exprimiert TOP (Accession Number: NM\_003249) mit einem C-terminalen Myc-tag.

## siRNA

Die in der vorliegenden Arbeit für Transfektionsexperimente verwendeten siRNA-Spezies wurden durch Gelfiltration aufgereinigt und sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Als Kontroll-siRNA wurde *siControl NON-Target plus* von Dharmacon verwendet.

---

<b><u>siRNA target</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>	<b><u>Oligonucleotid 5'-3' / Bestellnummer</u></b>
AP-B	Eurogentec	CGC CUG CUG UUA AAU ACA A
NRDc	Santa Cruz	SC-41550

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Zellkultur

##### **Zelllinie und Zellkultivierung**

HeLa-Zellen (humane Zervixkarzinomzellen) wurden in BASAL ISCOVE's Medium, supplementiert mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10 % FCS (hitzeinaktiviert) kultiviert. Die Zellen wurden in sterilen Zellkulturschalen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit aufbewahrt und alle 2-3 Tage passagiert. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen mit 1x PBS (10x PBS: 1,4 M NaCl, 90 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 27 mM KCl, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.2; autoklaviert) gewaschen und mit 0,5 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen) für 1-2 Minuten zum Ablösen inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit Kulturmedium gestoppt, wobei die Zellen gleichzeitig von der Platte gewaschen wurden. Die Zellen wurden weiterhin durch Zentrifugation für 5 min bei 1.000 rpm (Centrifuge GS-6KR) pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 1x PBS gewaschen, in frischem Kulturmedium resuspendiert und nach gewünschter Dichte ausgesät. Das Bestimmen der Zellzahl erfolgte, nach Verdünnen der Zellen mit Trypanblau, in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (Zellzahl \*10<sup>4</sup>/ml).

##### **Einfrieren und Auftauen von Zellen**

HeLa-Zellen wurden wie oben beschrieben pelletiert. Die Pellets wurden in 1 ml Kryomedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die befüllten

Kryoröhrchen wurden in vorgekühlten Kryoboxen platziert und über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um eine gleichmäßige Abkühlung der Zellen ( $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) zu gewährleisten. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Stickstoff Containern zur Langzeitlagerung aufbewahrt. Beim Auftauen von Zellen wurden entsprechende Kryoröhrchen im Wasserbad auf  $37^{\circ}\text{C}$  aufgewärmt und der Inhalt in 9 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Nach erneutem Pelletieren und Resuspendieren in 10 ml Kulturmedium wurden die Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert.

### **2.2.1.2 Transfektion von Zellen**

#### **Plasmid-Transfektion**

Für die transiente Transfektion des pcDNA3.1 Expressionsplasmids wurde das Reagenz Lipofectamine2000 (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dafür wurde Kulturmedium ohne Zusatz von Antibiotika auf die Zellen (2ml/6well) gegeben. Es wurden  $3\mu\text{g}$  pcDNA mit  $5\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz in OptiMEM Transfektionsmedium pro 6well eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 5-8 Stunden.

#### **siRNA-Transfektion**

Das X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche) wurde nach dem Protokoll des Herstellers für die transiente siRNA Transfektion verwendet. Zur gezielten Inhibition der Expression von Proteinen wurde eine spezifische siRNA bzw. zur Kontrolle eine unspezifische siRNA verwendet. Die Oligonukleotide wurden in einer Endkonzentration von 100-200nM eingesetzt. Transfektionsreagenz und siRNA wurden in OptiMEM Transfektionsmedium verdünnt auf die Zellen gegeben. 72 Stunden später wurden die Zellen für weitere Experimente verwendet und auf die erfolgreiche Reduktion der spezifischen Proteinexpression analysiert.



## 2.2.2 Biochemische Methoden

### 2.2.2.1 Zelllyse

1x10<sup>6</sup> HeLa-Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert und pelletiert. Das Pellet wurde in 50 µl Lysepuffer (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % Glycerol, 0,1 % Triton-X-100) resuspendiert und die Zellen durch drei *Frier-Tau-Zyklen* lysiert, wobei die Probe abwechselnd für ca. 2 min in flüssigen Stickstoff und in ein 37°C warmes Wasserbad getaucht wurde. Das Lysat wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C gereinigt und der Überstand für die Weiterverwendung konstant bei 4°C gelagert.

### 2.2.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen (nach Bradford, 1976)

Jeweils 10 µl der zu bestimmenden Probe wurden mit 100 µl der fertigen Gebrauchslösung Coomassie Plus Protein Reagenz (Pierce) versetzt und im Platten-Reader Dynex Opsys MR bei 595 nm gemessen.

### 2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

**4x SDS-Probenpuffer:** 250 mM Tris/HCl pH 7; 40 % (v/v) Glycerin; 16,7 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 9 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

**Sammelgel 5 %:** 167 mM Tris/HCl pH 6,8; 5 % (v/v) Acrylamid; 0,1 % (w/v) SDS; 0,07 % (w/v) APS; 0,05 % (v/v) TEMED

**Trenngel 15 %:** 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 15 % (v/v) Acrylamid; 0,1 % (w/v) SDS; 0,07 % (w/v) APS; 0,05 % (v/v) TEMED

**SDS-Laufpuffer:** 25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte nach dem Protokoll von Lämmli (1970). Die Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95° C denaturiert und auf ein Gel aufgetragen.

#### 2.2.2.4 Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native-PAGE)

**Nativ-Probenpuffer:** 50 mM Tris pH 7,5; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 % Glycerol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

**5 x Laufpuffer:** 0,45 M Tris HCl pH8,1-8,4; 0,45 M Borat; 10 mM  $\text{MgCl}_2$

**3,5 % Acrylamidgel:** 3,67 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; 1,1 ml 5 X Laufpuffer; 0,641 ml Acrylamid-Mix; 27  $\mu\text{l}$  APS (10 %); 2,7  $\mu\text{l}$  TEMED

**12 % Acrylamidgel:** 0,62 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; 1,1 ml 5 X Laufpuffer; 2,2 ml Acrylamid-Mix; 1,5 ml Glycerol; 27  $\mu\text{l}$  APS (10 %); 2,7  $\mu\text{l}$  TEMED

Es wurden je 3,5 ml der unterschiedlichen Acrylamidlösungen in einen Gradientenmischer gegeben und langsam unter Kühlung gemischt. Mit Hilfe einer Kanüle wurde die Acrylamidlösung zwischen die Glasplatten einer Biorad Elektrophoresekammer im Gradienten geschichtet. Die Proben wurden mit Nativprobenpuffer versetzt und nach Aushärtung des Gradientengels auf dieses aufgetragen. Zur Orientierung wurde ein Größenmarker (GE Healthcare) appliziert. Die Elektrophorese wurde bei 45 V und 4°C über Nacht ausgeführt. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt oder mittels Immunoblot analysiert.

#### 2.2.2.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

**Coomassie-Lösung:** 30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

**Entfärber:** 40 % Methanol, 10 % Essigsäure in  $\text{H}_2\text{O}$

Die Gele der SDS- oder Nativ-Gelelektrophorese wurden ~5 h bei RT in Coomassie-Lösung geschwenkt. Anschließend wurden die Gele so lange mit Entfärber inkubiert, bis die Banden gut zu sehen waren und der Hintergrund weitgehend farblos war.

#### 2.2.2.6 Immunoblot und Immunodetektion

**Transferpuffer:** 25 mM Tris; 200 mM Glycin; 25 % (v/v) Methanol

**Ponceau S-Lösung:** 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Ponceau S

**10x PBS:** 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; (pH 7,2 mit HCl einstellen)

**PBST:** 1x PBS; 0,4 % (v/v) Tween-20

**Blocklösung:** 1x PBS; 5 % (w/v) Magermilchpulver; 0,4 % (v/v) Tween-20

**Antikörper-Lösung:** 1x PBS; 2 % (w/v) Magermilchpulver; 0,1 % (v/v) Tween-20

Der elektrophoretische Transfer auf PVDF-Membranen (Millipore) erfolgte im Nass-Blot-Verfahren. Das Polyacrylamidgel und die PVDF-Membran wurden zwischen zwei in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren (Schleicher und Schuell) in die Blot-Apparatur (Bio-rad) mit der Membranseite zur Anode positioniert. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 60 min. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran mit Ponceau-Lösung angefärbt und anschließend mit PBST wieder entfärbt. Das Absättigen der Membran in Blocklösung erfolgte für 1 h schwenkend bei RT. Die Bindung des primären Antikörpers wurde über Nacht bei 4° C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für 10 min in PBST gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBST wurde das Signal mit ECL Plus *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers und einem Röntgenfilm Xomat-UV/AR/Biomax-MR (Kodak) detektiert.

### 2.2.2.7 Glycerolgradientenzentrifugation

**Glycerolgradientenpuffer:** 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 bzw. 30 % (v/v) Glycerol  
Glycerolgradientenpuffer mit 10 % und 30 % Glycerol wurden in Polyallomerröhrchen für den SW40 Rotor unterschichtet und im Gradientenmischer zu einem linearen Gradienten vermischt. Der Gradient wurde mit Zelllysate (4 bis 10 mg Protein) überschichtet und bei 208000xg ( $\omega t=1.0E12$ ) bei 4°C für 16h ultrazentrifugiert und anschließend mit dem Fraktionssammler in 500 µl Fraktionen von unten fraktioniert.

### **2.2.2.8 Aufreinigung der zytosolischen Peptidasen APB und NRDC**

#### **Vorbereitung der zellulären Proteine**

Die Peptidasen AP-B und NRDC wurden aus  $2 \times 10^9$  HeLa-Zellen wie folgt aufgereinigt. Zunächst wurde, wie beschrieben, das Zellpellet aufgeschlossen und das Lysat generiert. Das Lysat wurde in der Glycerolgradientenzentrifugation getrennt und fraktioniert. Die unterschiedlichen Fraktionen wurden anschließend mittels Aktivitätstests und Immunoblotanalysen nach den Peptidasen überprüft. Die Fraktionen, in denen AP-B und NRDC nachgewiesen werden konnten, wurden für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

Zur erfolgreichen Aufreinigung von AP-B wurden folgende Säulenchromatographien durchgeführt: Anionen-Austauschchromatographie (HiTrap DEAE Säule); MonoQ Anionen-Austauschchromatographie (MonoQ5/50 GL Säule).

Folgende Methoden wurden zur Aufreinigung von NRDC angewandt: Anionen-Austauschchromatographie (HiTrap DEAE Säule); MonoQ Anionen-Austauschchromatographie (MonoQ5/50 GL Säule); Gelfiltration (Superdex 200 10/300 GL Säule).

#### **Anionen-Austausch-Chromatographie**

Die vereinten Fraktionen der Glycerolgradientenzentrifugation wurden, nach Säulenequilibration mit Startpuffer (Puffer A: 50 mM Tris pH7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % Glycerol), über einen Superloop auf die HiTrap DEAE Säule in der FPLC-Anlage geladen. Die Säule wurde anschließend mit 2 ml Startpuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Danach wurden die Proteine in einem linearen zweistufigen Salzgradienten mit dem Elutionspuffer (Puffer B: 50 mM Tris pH7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % Glycerol, 1 M NaCl) von der Säule eluiert. Der Salzgradient war in folgende Stufen eingeteilt: Segment1: 30 % Puffer B in einem Volumen von 15 ml, Segment2: 100 % Puffer B über ein Volumen von 10 ml. Das Eluat wurde in 500 µl Fraktionen aufgefangen. Anschließend wurden die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen bestimmt und Immunoblotanalysen durchgeführt.

Um eine höhere Reinheit der Peptidasen zu erzielen, wurden die verschiedenen Fraktionen mit den stärksten AP-B oder NRDC Signalen nach der DEAE-Chromatographie jeweils vereint und MonoQ Anionen Austausch-Chromatographien mit den Proben durchgeführt. Um eine geringere Salzkonzentration zu erzielen, wurden die vereinten AP-B und NRDC Fraktionen vorerst 1:10 mit Startpuffer (Puffer A) verdünnt. Nach der Equilibrierung einer MonoQ 5/50 GL Säule mit Startpuffer wurden die verdünnten Proben unabhängig voneinander mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule geladen. Ungebundene Proteine wurden anschließend mit 2 ml Startpuffer von der Säule heruntergewaschen.

Zur Aufreinigung von AP-B wurden die Proteine in einem linearen dreistufigen Salzgradienten von der Säule eluiert. Dieser Salzgradient war in folgende Stufen eingeteilt: Segment1: 3 % Puffer B über ein Volumen von 1 ml, Segment2: 7,2 % Puffer B über ein Volumen von 30 ml und Segment3: 30 % Puffer B über ein Volumen von 5 ml.

Die Aufreinigung von NRDC erfolgte durch den folgenden linearen Dreistufen-Gradienten: Segment1: 16 % Puffer B über ein Volumen von 1 ml, Segment2: 50 % Puffer B über ein Volumen von 20 ml und Segment3: 100 % Puffer B über ein Volumen von 6 ml.

Das Eluat wurde jeweils in 500 µl Fraktionen aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend auf AP-B bzw. NRDC Aktivität getestet und im Immunoblot analysiert. Die Fraktionen mit entsprechenden Spitzenwerten der AP-B oder NRDC Aktivität wurden jeweils vereint.

Für die AP-B-Aufreinigung wurde die MonoQ-Anionen-Austausch-Chromatographie durch den gleichen dreistufigen Salzgradienten wiederholt, um den erwünschten Reinheitsgrad des Enzyms zu erzielen. Die resultierende Probe wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung auf Verunreinigungen überprüft.

Da die Aufreinigung von NRDC mittels MonoQ-Chromatographie u.a. Verunreinigungen bei niederen Molekulargewichten in der Coomassie-Färbung aufwies, wurde anschließend eine Gelfiltration zur Trennung nach dem Molekulargewicht durchgeführt.

### **Gelfiltration**

Für die Aufreinigung von NRDC erfolgte eine Gelfiltration mittels der Superdex 200 10/300 GL Säule. Bei diesem Verfahren wurden die vereinten MonoQ-Fraktionen mit NRDC-

Spitzenaktivitäten in der Gelfiltrationssäule filtriert und mit Startpuffer in 500 µl Fraktionen eluiert. Es wurden hierbei mehrmals 250 µl des MonoQ-Pools über einen entsprechenden Loop in das FPLC-System eingespritzt und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min bzw. 0,1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Proteine wurden in einem Volumen von 25 ml Startpuffer von der Säule eluiert. Dabei werden die verschiedenen Proteine dem Verfahren nach und entsprechend den Angaben des Herstellers der Größe nach getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf NRDC Aktivität getestet und die Reinheit mittels Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen überprüft. Abschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

### **2.2.2.9 Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten**

Die Bestimmung der proteolytischen Aktivitäten von AP-B, NRDC, TOP, POP und des Proteasoms erfolgte mittels fluorogener Peptidsubstrate (siehe 2.1.3 Substrate). Hierzu wurden Zellpellets wie oben beschrieben aufgeschlossen und die Proteinkonzentration gemessen. Anschließend wurden nach der Proteinbestimmung 5 µg Lysat pro Reaktion eingesetzt.

Erfolgte nach der Zelllyse die Glycerolgradientenzentrifugation, Anionen-Austausch-Chromatographie bzw. Gelfiltration, wurden für den Aktivitätstest 10 µl der jeweiligen Fraktion eingesetzt.

Die Aktivität von AP-B wurde in 50 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl mit 50 µM H-Arg-AMC Substrat gemessen. Die Aktivität von NRDC wurde in 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7.5 mit 100 µM Abz-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> bestimmt. Die TOP-Aktivität wurde mit 50 mM Tris pH7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> mit 50 µM Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp)-OH gemessen, POP-Aktivität in 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT mit 50 µM Z-Gly-Pro-AMC Substrat bestimmt und die Chymotrypsin ähnliche Aktivität des Proteasoms wurde mit 100 µM N-Succ-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC in 20 mM Tris pH 7.2, 1 mM EDTA und 1 mM NaN<sub>3</sub> ermittelt.

Die fluorogenen Peptidsubstrate wurden in DMSO in einer Ausgangskonzentration von 100 mM gelöst. Die Inkubation erfolgte in schwarzen Mikrotiterplatten in 100µl Gesamtvolumen bei 37°C. Die Fluoreszenz wurde bei 360nm Extinktion und 460nm Emission in Zeitintervallen von 30 min bestimmt. Zur spezifischen Inhibierung der Aktivitäten wurde 1 µM Bestatin

als Aminopeptidase-Hemmer eingesetzt sowie 200  $\mu\text{M}$  Arphaminin. Zur Hemmung der metalloproteolytischen Aktivität wurden 400  $\mu\text{M}$  Phenanthroline verwendet.

#### **2.2.2.10 In vitro APB-NRDc-Komplex Rekonstitution**

Zur *in vitro* Rekonstitution des APB-NRDc-Komplexes wurden unterschiedliche Konzentrationen (0-72 nM) der aufgereinigten Peptidasen gemeinsam in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  in Gelfiltrationspuffer (50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 % Glycerol) bei 37° C für 30 bis 120 Minuten inkubiert. In der Kontrolle erfolgte jeweils analog die Inkubation von AP-B oder NRDc sowie AP-B und NRDc zusammen mit ansteigenden BSA Konzentrationen. Anschließend wurden für jeden Ansatz die proteolytische Aktivität von AP-B und NRDc bestimmt und eine Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Nach dem gleichen Prinzip wurden ebenfalls die *in vitro* Prozessierungen mit synthetischen Peptiden vorgenommen (siehe 2.2.2.11).

#### **2.2.2.11 In vitro Prozessierung von synthetischen Peptiden**

Zur *in vitro* Prozessierung wurden 1  $\mu\text{g}$  des synthetischen Peptids (siehe Material 2.1.5) mit unterschiedlichen Konzentrationen von aufgereinigtem APB- bzw. NRDc-Enzym, allein oder in Kombination, in 20  $\mu\text{l}$  Verdaupuffer (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 % Glycerol) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  3 % TFA zum entsprechenden Zeitpunkt gestoppt. Die Proben wurden mittels HPLC oder Massenspektrometrie analysiert.

#### **2.2.2.12 HPLC**

Die Prozessierungsansätze aus 2.2.2.11 wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) getrennt. Hierbei wurde das Verfahren der RP-HPLC (*reversed phase*-HPLC) angewandt. Dabei wird eine unpolare stationäre Phase verwendet. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Wasser und Acetonitril eingesetzt. Die Trennung der Prozessierungsansätze erfolgte durch das HPLC-Gold-System von Beckman Coulter. Die Trennung der HCMVpp65-Prozessierung wurde in einem Acetonitril-Gradient von 10 % bis 100 % durchgeführt. Für die Trennung der Arg-Enkephalin

Prozessierungsansätze wurde ein Gradient von 40 % bis 100 % Acetonitril verwendet. Die Proben wurden mit einem Volumen von 20 µl pro Ansatz in das System eingespritzt und die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Detektion der Absorption erfolgte bei 314 nm. Die resultierenden Daten wurden mit Hilfe der 32 Karat Gold Software von Beckman Coulter bezüglich Retentionszeiten und der Flächeninhalte auf Produktidentität und Menge ausgewertet.

### **2.2.2.13 Ko-Immunopräzipitation**

Immunpräzipitation (IP) stellt eine Methode dar, mit der über spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen ein gesuchtes Protein gezielt aus einem Gemisch isoliert und dabei unter geeigneten Bedingungen Interaktionspartner dieses Proteins identifiziert werden können.

#### **Bindung der Antikörper an die Beads**

Die spezifischen Antikörper  $\alpha$ AP-B und  $\alpha$ NRDc wurden zuerst an einen Mix aus Protein-A und Protein-G Sepharose-Beads (1:1) gebunden. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 400 µl 25 µl Antikörperserum mit 100 µl Beads-slurry (vorgewaschen nach Hersteller) und aufgefüllt mit IP Puffer (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol) über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads mit 1xPBS dreimal gewaschen und bei 2.000 rpm zentrifugiert.

#### **Präparation der Lysate**

Für die Immunpräzipitation wurden die Zellpellets wie oben beschrieben lysiert. Anschließend wurden Zellfragmente für 15 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Das Lysat wurde abgenommen und die Proteinkonzentration über den Bradford Assay bestimmt. Es wurde ~1mg Protein pro IP eingesetzt.



### **IP mit Antikörper-gebundenen Beads**

Für eine IP wurden pro Ansatz 50 µl der Beads eingesetzt, welche mit Lysat in einem Gesamtvolumen von 500 µl für 4h bei 4°C langsam rotierend inkubiert wurden. Anschließend wurden die Beads für 2 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert und von den Überständen ein Aliquot für weitere Analysen abgenommen. Danach wurden die Beads dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen, wobei der zweite Waschschrift mit erhöhtem Salzgehalt (+300 mM NaCl) erfolgte, um unspezifisch gebundene Proteine effektiv zu entfernen.

### **Elution**

Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in 35 µl 2x SDS-Probenpuffer (5x SDS-Probenpuffer: 420 mM Tris, 0,6 M DTT, 30 % Glycerol, 10 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau) für 10 min bei 95 auf einem Schüttelinkubator. Die Beads wurden für 2 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert und das Eluat abgenommen. Alle Proben sowie Lysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot analysiert.

### **2.2.1.14 Proteinidentifizierung**

Zur Identifizierung der zytosolischen Peptidasen AP-B und NRDC wurden einzelne Spots aus Coomassie-gefärbten SDS-Gelen ausgestochen und durch Frau Dr. K. Janek oder Frau A. Niewianda (Institut für Biochemie) mittels Peptidmassen-Fingerprint-Analyse charakterisiert. Dafür wurden die Gelstücke zunächst gewaschen, ein tryptischer Verdau im Gel durchgeführt und die resultierenden Peptide mittels MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, APPLIED BIOSYSTEMS) analysiert.

### **2.2.2.15 Massenspektrometrie**

Massenspektrometrische Analysen von *in vitro* Prozessierungsprodukten ermöglichten deren Identifizierung und Quantifizierung. Die Proben wurden zunächst über reverse-Phase HPLC (µRPC C2/C18 2.1/10 Säule, Amersham) chromatographisch getrennt und die eluierten Fragmente wurden direkt online durch das Elektrospray Ionisierung-Massenspektrometer (ESI-MS) (LCQ-Deca; ThermoFisher) detektiert. Die Proben wurden mit dem internen Stan-

dard 9GPS (YPHFMPNLGPS) zur Kontrolle der Messbedingungen gemischt und in das HPLC System Surveyor (Thermofisher) injiziert. Die Elution erfolgte über einen Gradienten 3- 67 % B in 30 min, der substratspezifisch optimiert wurde. Als Laufmittel wurden A 0,05 % TFA und B 70 % Acetonitril, 0,045 % TFA verwendet. Die Analyse erfolgte im Massenbereich 200- 2.000 Da. Hierbei konnten die Fragmente über das Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  und anschließender Fragmentierung in der Ionenfalle identifiziert werden. Dabei wurde mittels der Auswertesoftware BioWorks ein Vergleich von theoretisch errechneten und den praktisch gemessenen MS/MS-Spektren erstellt. Eine Quantifizierung der generierten Prozessierungsprodukte konnte mittels der Software LCQuan (2.5) durchgeführt werden und erfolgte entweder im Vergleich zu synthetischen Peptiden oder über die Kombination der ermittelten Parameter  $m/z$  der MS und Retentionszeit in der Chromatographie. Hierbei stellte die Integration des detektierten Signals ein Maß für die relative Menge des entsprechenden Verdauprodukts dar. Über die graphische Darstellung der relativen Intensität gegen die Zeit konnte eine entsprechende Kinetik erstellt werden. Die Analyse der absoluten Quantifizierung der 9mer, 10mer und 11mer HCMVpp65-Prozessierungsprodukte (siehe Ergebnisse 3.7.1) erfolgte mittels einer Titrationskurve der synthetisch hergestellten Peptide. Anhand der Titrationskurven konnten die genauen Konzentrationen der entstandenen Prozessierungsprodukte ermittelt werden. Zur Auswertung der massenspektrometrischen Daten und Spektren wurden des Weiteren die Programme Xcalibur, Paws, Extraktor-B5 angewendet. Die Darstellung erfolgte mittels EXCEL (Microsoft). Die massenspektrometrischen Analysen und z. T. Auswertungen wurden von Kathrin Textoris-Taube (Institut für Biochemie-Charité, Berlin) durchgeführt.

### **2.2.3 Immunologische Methoden**

#### **2.2.3.1 pp65<sub>495-503</sub> spezifische CTL Stimulation**

Im Anschluß an die siRNA (72 Stunden) und pcDNA (24 Stunden) Transfektion wurden die Zellen mit pp65<sub>495-503</sub> spezifischen CTL in 96well-Platten kokultiviert. Hierzu wurden  $2,5 \cdot 10^4$  Zielzellen mit  $1-2 \cdot 10^4$  spezifischen T-Zellen in RPMI mit AB-Serum inkubiert und die Epitop-Präsentation indirekt über die Freisetzung von Interferon- $\gamma$  durch die aktivierten CTLs

bestimmt. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in 0,008% Glutaraldehyd für 3min auf Eis fixiert, gewaschen und für die Kokultivierung ausgesät. Als Kontrolle wurden T2 Zellen eingesetzt, die mit bzw. ohne pp65<sub>495-503</sub> Peptid beladen wurden. Nach Inkubation für 16 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen in der 96well-Platte zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Schließlich konnte die Interferon- $\gamma$  Konzentration in den Überständen mittels „sandwich“-ELISA gemessen werden.

### **2.2.3.2 Interferon- $\gamma$ Konzentrationsbestimmung mittels ELISA**

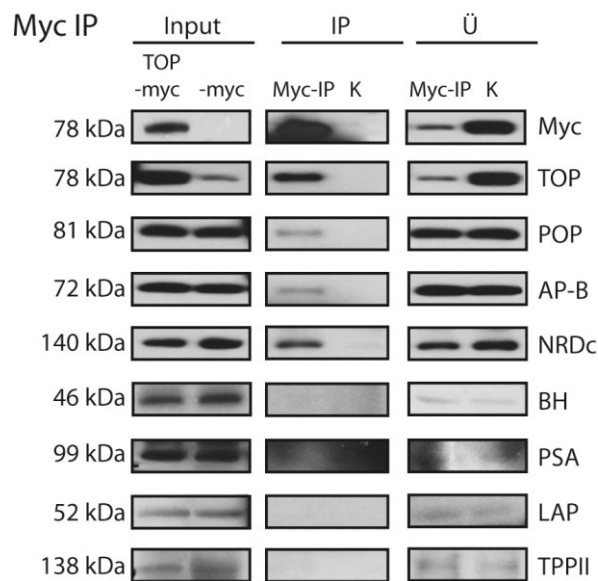
Für den ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) wurden 96well-F-Platten mit dem spezifischen primären Ak (1-D1K; 2 $\mu$ g/ml; 100 $\mu$ l/well; in PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet. Durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween20) wurden ungebundene Reste entfernt. Dieser Waschschrift wurde nach jeder folgenden Anwendung wiederholt. Durch die Inkubation der 96well-F-Platten in Blockpuffer (PBS, 1% BSA) für 1h bei RT wurden unspezifische Bindungen abgesättigt. Nun wurden die einzelnen Proben (50  $\mu$ l/well) auf die Platte aufgetragen sowie eine Standardkonzentrationsreihe aus rekombinant hergestellten humanen Interferon- $\gamma$  und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Als nächstes erfolgte die Zugabe des biotinylierten sekundären Antikörper (7-B6-1; 1 $\mu$ g/ml; 100 $\mu$ l/well; in Waschpuffer) für 1 Stunde bei RT. Daraufhin wurde die Streptavidin-konjugierte HRP (1:1.000; 100 $\mu$ l/well; in Waschpuffer) hinzugefügt. Im Anschluß der einstündigen Inkubation bei RT wurde das Substrat Tetramethylbenzidine (TMB) (100 $\mu$ l/well) zugegeben, welches während der 30minütigen Inkubation im Dunkeln in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50 $\mu$ l/well) gestoppt. Die Platte wurde photometrisch bei 450nm im Spectrofluorimeter gemessen. Die Bestimmung der Zytokinkonzentration erfolgte über die Interferon- $\gamma$  Standardkurve.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis eines heteromeren Komplexes zytosolischer Peptidasen

Da bisher unklar ist, inwiefern ein Zusammenwirken von zytosolischen Peptidasen bei der Prozessierung von MHC-Klasse-I-Vorläuferpeptiden erfolgt und ob es sich dabei um die Bildung von Peptidase-Komplexen handelt, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Interaktion von verschiedenen zytosolischen Peptidasen getestet.

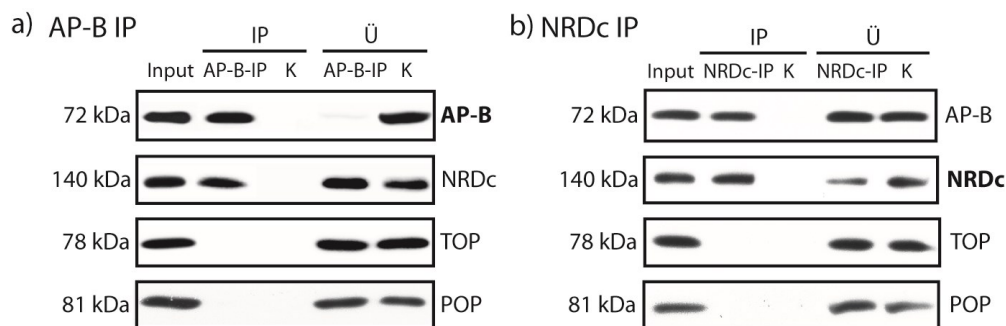
Um zu analysieren, ob die zytosolischen Peptidasen TOP, POP, AP-B, NRDC, BH, PSA, LAP und TPPII interagieren können, wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden HeLa-Zellen transient mit einem TOP-myc-Expressionsplasmid transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mittels *Frier-Tau-Lyse* aufgeschlossen und die Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. In der SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotanalyse konnte die Ko-Immunpräzipitation der verschiedenen zytosolischen Peptidasen analysiert werden (**Abb. 3.1**)



**Abb. 3.1 Ko-Immunpräzipitation von POP, AP-B und NRDC aus dem Lysat von TOP-Myc exprimierenden HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen wurden mit einem TOP-myc-Plasmid transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mittels *Frier-Tau-Lyse* aufgeschlossen und das Lysat mit einem Myc Antikörper inkubiert. Mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotanalyse wurde das Ergebnis der Ko-IP mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Als Input wurde das Lysat der TOP-myc-Plasmidvektor (TOP-myc) bzw. der pcDNA3.1-myc Leervektor (-myc) transfizierten HeLa-Zellen aufgetragen. IP=Immunpräzipitation; Ü=Überstand; K=Kontroll-IP mit pcDNA3.1-myc Leervektor (-myc) transfizierten HeLa-Zellen.

Aufgrund der Detektion von TOP-Myc in der Immunoblotanalyse des HeLa-Zelllysates handelte es sich um eine effiziente Überexpression des Proteins (**Abb.3.1**). In der IP konnte TOP-Myc ebenfalls deutlich präzipitiert werden. Durch die weitere Detektion von POP, AP-B und NRDC konnte die Ko-Immunpräzipitation dieser Peptidasen gezeigt werden. Demnach würden TOP, POP, AP-B und NRDC unter den Bedingungen der TOP-Myc Überexpression in HeLa-Zellen interagieren. Im Gegensatz dazu konnten die weiteren zytosolischen Peptidasen BH, PSA, LAP und TPPII nicht in der Immunpräzipitation detektiert werden. Dieser Befund zeigt, dass keine Interaktion dieser Peptidasen mit TOP-Myc besteht. Das Ergebnis dieses Experimentes deutet jedoch erstmals auf eine Interaktion der Peptidasen TOP, POP, AP-B und NRDC hin. Dennoch handelt es sich um die Überexpression von TOP-Myc und spiegelt nicht die natürlichen Eigenschaften der Zelle wider. Deshalb sollte getestet werden, ob die Peptidasen in HeLa-Zellen ohne Überexpression ebenfalls interagieren können. Hierzu wurden anti -TOP, -POP, -AP-B und -NRDC Antikörper in Immunpräzipitationsexperimenten geprüft.

Die AP-B und NRDC Antikörper führten zu einer ausreichenden Präzipitation der jeweiligen Peptidase aus dem Zelllysate. Hingegen präzipitierten der TOP und der POP Antikörper die entsprechenden Peptidasen kaum (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die folgenden Immunpräzipitationsexperimente ausschliesslich mit den AP-B und NRDC Antikörpern durchgeführt. Hierfür wurde HeLa-Zelllysate mittels *Frier-Tau-Lyse* aufgeschlossen und jeweils mit NRDC oder AP-B Antikörper, gebunden an Protein-A/-G Sepharose-Beads, inkubiert. In der SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotanalyse konnte die Ko-Immunpräzipitation der verschiedenen zytosolischen Peptidasen analysiert werden (**Abb.3.2**).



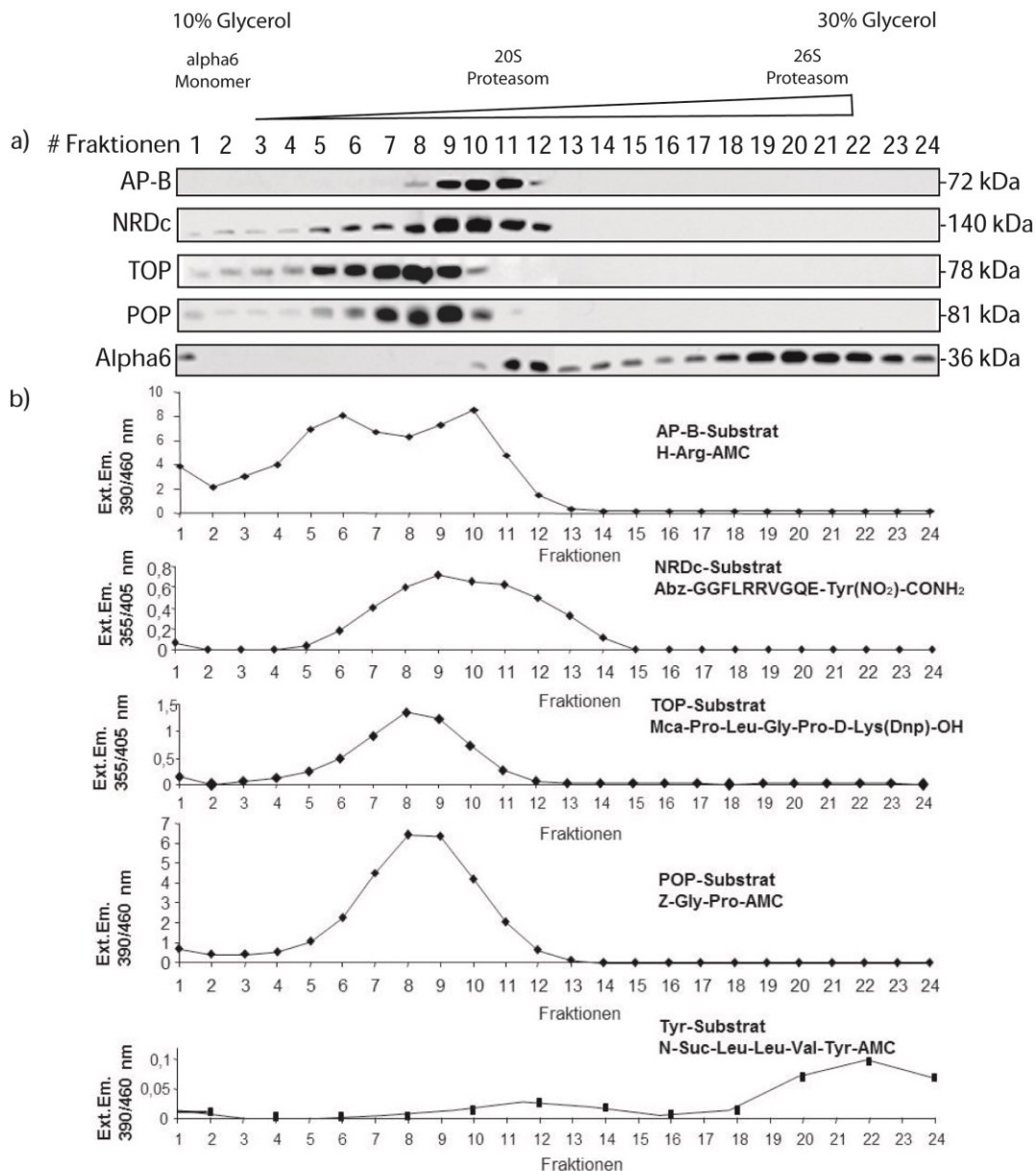
**Abb. 3.2 Ko-Immunpräzipitation von AP-B und NRDC aus HeLa-Zelllysate.** HeLa-Zellen wurden lysiert und die Lysate mit AP-B oder NRDC Antikörper inkubiert. Anschliessend wurde die Ko-IP mittels den angegebenen Antikörpern im Immunoblot analysiert. a) AP-B-IP; b) NRDC-IP. IP=Immunpräzipitation; Ü=Überstand; K=Kontrolle mit Prä-Immunsereum.

In der **Abb. 3.2** ist zu sehen, dass AP-B und NRDC jeweils in der IP detektiert wurden, wodurch die Ko-Immunpräzipitation der beiden Peptidasen gezeigt werden konnte. Demnach scheinen AP-B und NRDC in einem heteromeren Komplex assoziiert zu sein. Im Gegensatz dazu konnten die zytosolischen Peptidasen TOP und POP nicht in der IP detektiert werden. Dieser Befund zeigt, dass die TOP-Myc Überexpression nicht den natürlichen Bedingungen der Zelle entspricht. Für die Peptidasen LAP, PSA, BH und TPPII konnte ebenfalls keine Interaktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). D.h. es kommt unter den untersuchten Peptidasen nur zur Interaktion zwischen der Endopeptidase NRDC mit der Aminopeptidase AP-B. Bisherige Befunde von *in vitro* Prozessierungen zeigten, dass NRDC und AP-B in der Prohormon-Prozessierung durch sequentielle Aktivitäten zusammenwirken (Foulon et al, 1997; Gluschkof et al, 1987; Gomez et al, 1988). Zudem konnten die beiden Peptidasen in

sekretorischen Vesikeln von Langerhans-Zellen durch Immunfluoreszenzanalysen gemeinsam mit dem Peptidhormon Glukagon ko-lokalisiert werden (Fontes et al, 2005). In der hier vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals die Interaktion der beiden Peptidasen in HeLa-Zellen mittels Ko-Immunpräzipitation und Immunoblotanalyse demonstriert.

### **3.2 Die Peptidasen AP-B und NRDC weisen gleiche Charakteristika bezüglich ihrer Sedimentation im Glycerolgradienten auf**

Das Ergebnis der Ko-Immunpräzipitation weist auf die Interaktion der zytosolischen Peptidasen NRDC und AP-B hin. Um die Sedimentation der Peptidasen und des Peptidase-Komplexes in der Glycerolgradientenzentrifugation zu vergleichen, wurde HeLa-Zelllysat über Glycerolgradientenzentrifugationen analysiert. Hierfür wurden Gradienten mit 10 bis 30 % Glycerol verwendet. Im Anschluss an die Ultrazentrifugation wurden die Gradienten fraktioniert. Mittels Immunoblotanalysen und Aktivitätstests konnten die einzelnen Fraktionen auf die Peptidasen AP-B, NRDC, TOP und POP geprüft werden (**Abb.3.3**). Aufgrund bekannter Sedimentationseigenschaften von verschiedenen Proteasomen-Komplexen konnte eine Zuordnung der Fraktionen zu entsprechenden Molekulargewichten getroffen werden.



**Abb. 3.3 Glycerolgradientenzentrifugation von HeLa-Zelllysatz zur Analyse der Sedimentationseigenschaften von AP-B und NRDC.** Glycerolgradienten von 10 bis 30% Glycerol wurden mit HeLa-Zelllysatz beschichtet, ultrazentrifugiert und in Fraktionen mit einem Volumen von 500 µl fraktioniert. a) Immunoblotanalyse der einzelnen Fraktionen des Glycerolgradienten mittels der TOP, POP, AP-B, NRDC und α6 (Untereinheit des Proteasoms) Antikörper. b) Analyse der enzymatischen Aktivitäten mittels der fluorogenen Substrate. Für TOP wurde das MCA-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp)-OH Substrat, für POP das Z-Gly-Pro-AMC, für AP-B das H-Arg-AMC und für NRDC das Abz-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> Substrat verwendet. Die proteasomale Aktivität wurde mittels des Substrats N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC detektiert. Aufgrund bekannter Sedimentationseigenschaften des 20S- und des 26S-Proteasoms sind diese Proteinkomplexe oberhalb des Gradienten gekennzeichnet.



Mittels des  $\alpha 6$  Antikörpers konnte die Sedimentation des 20S Proteasoms, welches ein Molekulargewicht von  $\sim 700$  kDa aufweist, in den Fraktionen 11 und 12 der Immunoblotanalyse der Glycerolgradientenzentrifugation nachgewiesen werden (**Abb.3.3a**). Dies zeigt, dass in den Fraktionen 11 und 12 des Glycerolgradienten Proteinkomplexe mit einer Größe von 700 kDa vorhanden waren. Die Peptidase NRDC sedimentierte in den Fraktionen 2-12. D.h., dass NRDC als Monomer, innerhalb von unterschiedlichen Vorläuferpartikeln oder in Komplexen von annähernd 700 kDa in der Zelle vorkommen kann. Aufgrund der Detektion der stärksten Signale in den Fraktionen 8-12 scheint der größere Anteil von NRDC zu Komplexen von annähernd 700 kDa zu interagieren. AP-B wurde ebenfalls in den Fraktionen 8-12 detektiert und ko-sedimentiert demnach in den Fraktionen mit NRDC. Diese Ergebnisse zeigen, dass AP-B überwiegend zu Komplexen mit einem Molekulargewicht von annähernd 700 kDa in der Zelle assoziiert ist und mit NRDC in den entsprechenden Fraktionen interagieren kann. Die Peptidasen TOP und POP sedimentierten zusammen in den Fraktionen 1-9 und demnach unterschiedlich zu AP-B und NRDC, wobei Überlappungen in den Fraktionen 8 und 9 zu erkennen sind.

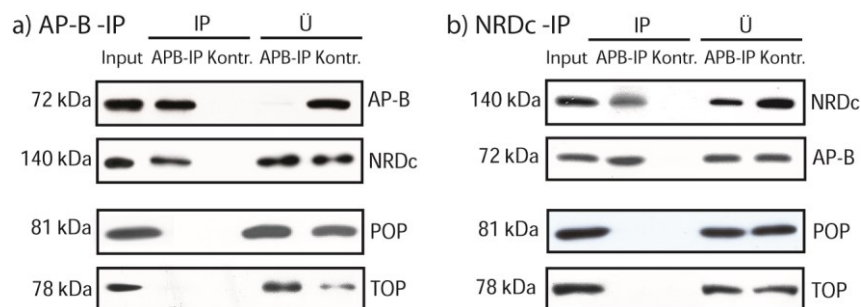
Das Ergebnis der Immunoblotanalyse wurde mittels Aktivitätstests überprüft. Dabei wurden in den Fraktionen des Glycerolgradienten die Peptidase Aktivitäten mittels fluorogener Peptidsubstrate gemessen. Hierzu wurde für die AP-B Aktivität das Substrat H-Arg-AMC, für die POP Aktivität Z-Gly-Pro-AMC und die proteasomale Aktivität das N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC verwendet, welche durch C-terminalen Schnitt nach Arginin, Prolin bzw. Tyrosin die fluoreszierende AMC-Gruppe freisetzen. Für die NRDC Aktivität wurde das Substrat Abz-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> und für die TOP Aktivität das MCA-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp)-OH eingesetzt, in denen es durch Schnitte N-terminal der Arginin-Reste durch NRDC und N-terminal von Glycin-Resten durch TOP zur Emission der Fluoreszenz durch die Abz- und MCA-Gruppe kommt, welche nach der Spaltung nicht mehr durch die C-terminalen Quencher Tyr(NO<sub>2</sub>) und Dnp abgefangen wird. Nach Inkubation der Substrate mit den Fraktionen wurde die Fluoreszenz photometrisch gemessen und die Substrataktivitäten in **Abb.3.3b** graphisch dargestellt.

Entsprechend der Immunoblotanalyse konnten die AP-B und NRDC Aktivitäten in den Fraktionen 8-12 detektiert werden. Bei der Messung der AP-B-Aktivität wurde zusätzlich ein zweiter Aktivitätspeak in den Fraktionen 4-7 gemessen. Dies deutet auf die Umsetzung des H-Arg-

AMC Substrates durch weitere Peptidasen hin, da in diesen Fraktionen keine AP-B-Proteinbande im Immunoblot detektiert wurde. Die stärksten Aktivitäten von TOP und POP wurden in den Fraktionen 7-9 entsprechend der Immunoblotanalyse nachgewiesen. Auch die Aktivität des 20S und des 26S Proteasoms konnte in den Fraktionen 11-12 bzw. 19-24 verifiziert werden. Zusammenfassend zeigt das Experiment der Glycerolgradientenzentrifugation, dass die Peptidasen AP-B und NRDC, in Fraktionen mit dem 20S Proteasom mit einem Molekulargewicht von ~700 kDa, ko-sedimentieren. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die schon in der IP aufgezeigte Interaktion von AP-B und NRDC. Da durch dieses Experiment jedoch nicht die Assoziation der Peptidasen gezeigt werden kann, wurden in einem weiteren Schritt wieder Ko-IP-Experimente durchgeführt.

### 3.2.1 AP-B und NRDC können aus den Fraktionen des Glycerolgradienten ko-präzipitiert werden

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die zytosolischen Peptidasen NRDC und AP-B annähernd mit dem 20S Proteasom, mit einem Molekulargewicht von ~700 kDa, nach der Glycerolgradientenzentrifugation ko-sedimentierten. Um eine Komplexbildung der ko-sedimentierenden Peptidasen in den entsprechenden Fraktionen nachzuweisen, wurden die Fraktionen 6-12 des Glycerolgradienten vereint und die beiden Peptidasen mit den AP-B oder NRDC Antikörpern immunpräzipitiert. Anschliessend wurden die Präzipitate im Immunoblot analysiert (**Abb. 3.4**).



**Abb. 3.4 Ko-Immunpräzipitation von AP-B und NRDC aus Glycerolgradienten Fraktionen.** Die Fraktionen 6-12 der Glycerolgradientenzentrifugation wurden vereint und jeweils mit (a) AP-B und (b) NRDC Antikörper, jeweils gebunden an Protein A und Protein G Sepharose-Beads, inkubiert. Anschliessend wurden die Präzipitate mittels der angegebenen Antikörper im Immunoblot analysiert. IP=Immunpräzipitation; Ü=Überstand; K=Kontrolle mit Prä-Immunsersum.

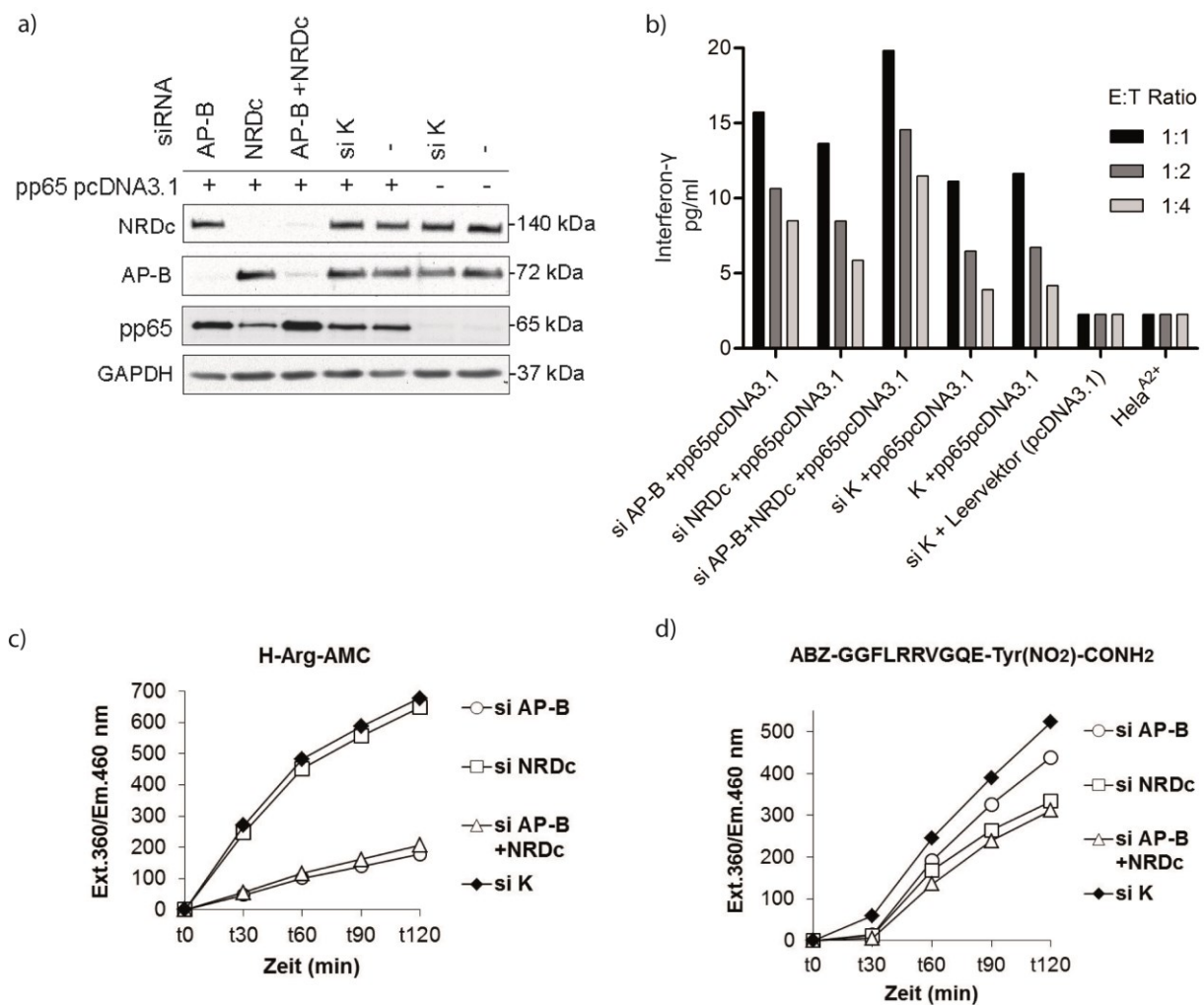
Die **Abb.3.4** zeigt, dass nach der Immunpräzipitation mit dem AP-B Antikörper NRDC im Präzipitat nachgewiesen wurde. Demnach konnte NRDC aus den Fraktionen des Glycerolgradienten ko-präzipitiert werden. Nach der NRDC-Immunpräzipitation konnte ebenfalls AP-B im Präzipitat detektiert werden. Damit wurde die Interaktion der beiden Peptidasen in den Fraktionen 6-12 nach der Glycerolgradientenzentrifugation nachgewiesen. Die Immunpräzipitation zeigte jedoch keine Interaktion von TOP und POP mit AP-B und NRDC. Dieses Experiment demonstriert zwar noch nicht die direkte Interaktion von AP-B und NRDC, zeigt aber, dass die beiden Peptidasen zusammen in Komplexen organisiert vorkommen. Da der detektierte AP-B-NRDC-Komplex nach der Glycerolgradientenzentrifugation ein Molekulargewicht von annähernd 700 kDa aufweist, könnten in der Zelle mehrere AP-B und NRDC-Moleküle miteinander interagieren.

Da die beiden zytosolisch lokalisierten Peptidasen mit der Prozessierung von MHC-Klasse-I-Peptiden assoziiert wurden (Kessler et al, 2011; Urban et al, 2012), sollte im folgenden Abschnitt der Einfluss der beiden Peptidasen zusammen auf die Prozessierung eines spezifischen MHC-Klasse-I-Epitops mittels siRNA-Experimenten und CTL-Assays analysiert werden.

### **3.3 siRNA *knockdown* der beiden zytosolischen Peptidasen AP-B und NRDC führt zu einer erhöhten Epitop-Präsentation**

In dem vorausgehenden Experiment konnte eine Interaktion von NRDC und AP-B in HeLa-Zelllysaten gezeigt werden. NRDC und AP-B spielen beide eine Rolle bei der MHC-Klasse-I-Epitop-Präsentation, wobei NRDC an einer spezifischen Tumor-Epitop-Generierung beteiligt ist (Kessler et al, 2011) und AP-B einen negativen Effekt auf die Präsentation eines spezifischen HCMVpp65-Epitops aufweist, da der siRNA *knockdown* von AP-B zu einer verstärkten Epitop-Präsentation führte (Urban et al, 2012). Deshalb wurde untersucht, ob eine Interaktion der beiden zytosolischen Peptidasen AP-B und NRDC die MHC-Klasse-I-Epitop-Präsentation beeinflusst. Um diese Frage zu klären, wurden HLA-A2 exprimierende HeLa-Zellen (Hela<sup>A2+</sup>-Zellen) transient mit einem HCMVpp65 Expressionsplasmid transfiziert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit der entsprechenden siRNA gegen die jeweilige Peptidase, bzw. in

einem Doppelansatz mit siRNA gegen AP-B und NRDC, kotransfiziert und anschliessend mit Epitop-spezifischen CTL über Nacht kokultiviert. Die veränderte Epitop-Präsentation wurde anhand der Interferon- $\gamma$  Produktion im ELISA, als Resultat der CTL-Aktivierung, gemessen (**Abb.3.5a**).



**Abb.3.5 CTL Assay.** a) Immunoblot zur Testung der siRNA *knockdowns* der Peptidasen. b) CTL Assay nach unterschiedlichem *knockdown* der Peptidasen AP-B und NRDC in HeLa Zellen transient transfiziert mit pp65 Plasmid für 24h. siK= Kontroll siRNA (scrambled siRNA), pcDNA3.1= Kontrollvektortransfektion ohne pp65, psg=H2A\*positive Hela Zellen, CTL:Zielzellen 1:1 (schwarze Balken), CTL:Zielzellen 1:2 (graue Balken), CTL:Zielzellen 1:4 (weiße Balken). c) AP-B Aktivitätstest mit dem fluorogenen Substrat H-Arg-AMC zur Testung des AP-B *knockdowns*. d) NRDC Aktivitätstest mit dem fluorogenen Substrat ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> zur Testung des NRDC *knockdowns*. si K=Dharmacon Kontroll siRNA; K=Kontrolle ohne siRNA

Die SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot-Analyse verifiziert den siRNA-*knockdown* der Peptidasen und die Transfektion des HCMVpp65-Plasmids (**Abb.3.5a**). In dem Immunoblot konnte das pp65-Protein für die Transfektionsansätze deutlich detektiert werden. Damit wurde das Protein effizient in den Zellen exprimiert, wobei die mit AP-B bzw. mit AP-B und NRDC siRNA behandelten Zellen eine leicht verstärkte Expression des HCMVpp65-Proteins bei der transienten Transfektion aufwiesen.

Als Folge des effizienten *knockdown* wurde für AP-B eine verstärkte CTL-Antwort gegenüber der Kontroll-siRNA detektiert (**Abb.3.5b**). Dies entspricht den Daten von Urban et al. und deutet ebenfalls auf einen negativen Effekt von AP-B auf die HCMVpp65-Epitop-Präsentation hin (Urban et al, 2012). Die NRDC siRNA behandelten Zellen zeigten ebenfalls eine verstärkte CTL-Antwort, die jedoch geringer war als bei den AP-B siRNA behandelten Zellen. Allerdings wurde in diesem Ansatz auch weniger pp65-Protein im Gegensatz zu den AP-B-siRNA behandelten Zellen mittels Immunoblotanalyse im Zelllysate detektiert. Der Doppel-*knockdown* von AP-B und NRDC hatte hingegen einen deutlich positiven Effekt auf die HCMVpp65-Epitop-Präsentation. Dieses Ergebnis deutet somit darauf hin, dass NRDC und AP-B zusammen die HCMVpp65 Epitop-Präsentation verstärkt reduzieren. Demnach wird der negative Effekt von AP-B oder NRDC allein auf die HCMVpp65 Epitop-Präsentation durch die Zusammenarbeit der Peptidasen gesteigert.

Zur Bestätigung des *knockdown* von AP-B oder NRDC, bzw. von AP-B und NRDC, wurden in Zelllysaten von siRNA behandelten Zellen sowie unbehandelten Zellen die Peptidase Aktivitäten mittels der fluorogenen Peptidsubstrate gemessen. Hierzu wurde für AP-B das Substrat H-Arg-AMC und für NRDC das ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> verwendet. Nachdem die fluorogenen Substrate mit den Zelllysaten inkubiert wurden, wurde die Fluoreszenz in Zeitintervallen photometrisch bestimmt und graphisch dargestellt (**Abb. 3.5c, d**). Die photometrischen Messungen bestätigten die verringerten proteolytischen Aktivitäten der beiden Peptidasen in den Zelllysaten. Die siRNA gegen AP-B führte zu einer deutlich reduzierten proteolytischen Aktivität der Peptidasen im Lysat gegenüber der Kontroll-siRNA (**Abb.3.5c**). Auch der Doppel-Ansatz mit siRNA gegen AP-B und NRDC bewirkte die gleiche Verminderung der AP-B Aktivität, wohingegen die siRNA gegen NRDC keinen Einfluss auf die AP-B-Aktivität aufwies. Die siRNA gegen NRDC führte zu einer gering verringerten proteolytischen NRDC Aktivität gegenüber der Kontroll-siRNA (**Abb.3.5d**). Der Doppel-Ansatz mit siRNA

gegen NRDC und AP-B reduzierte die NRDC Aktivität ebenfalls vergleichbar. Die AP-B siRNA hatte kaum einen Einfluss auf die NRDC Aktivität. Da nicht die vollständige Reduktion der NRDC Peptidase Aktivität in den jeweiligen siRNA Ansätzen beobachtet wurde, können funktionales Restprotein der Peptidase vorhanden gewesen sein. Andererseits könnten noch andere Peptidasen im Zelllysate das fluorogene Peptidsubstrat umsetzen.

Schliesslich zeigte das Ergebnis des CTL-Assays, dass der *knockdown* der zytosolischen Peptidase AP-B zu einer gesteigerten HCMVpp65-Epitop-Präsentation führt. Der Doppel-*knockdown* der Peptidasen AP-B und NRDC führte nochmals zu einer deutlich gesteigerten Epitop-Präsentation gegenüber dem Ansatz mit AP-B siRNA, wohingegen der NRDC *knockdown* eine leicht verstärkte Epitop-Präsentation aufwies. Damit konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von AP-B und NRDC zu einer verringerten HCMVpp65-Epitop-Präsentation führt und dadurch möglicherweise den verstärkten Abbau des Epitops im Zytosol bewirkt.

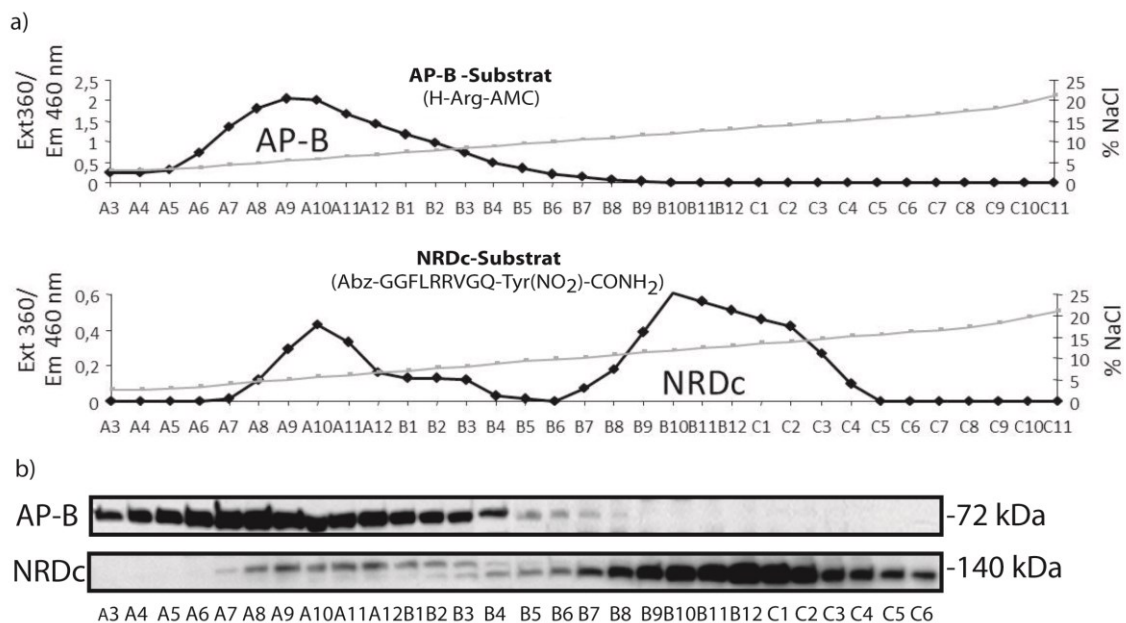
Um den AP-B-NRDC-Komplex weiterhin zu charakterisieren und einen möglicherweise verstärkten Abbau des HCMVpp65-Epitops zu prüfen, wurden in den folgenden Abschnitten die beiden Peptidasen aus HeLa-Zellen aufgereinigt und anschliessend eine *in vitro* Rekonstitution des Komplexes durchgeführt. Mittels des *in vitro* rekonstituierten AP-B-NRDC-Komplexes sollte der Einfluss der Interaktion auf die Prozessierung unterschiedlicher Substrate, u.a. eines HCMVpp65-Peptids, ermittelt werden.

### **3.4 Aufreinigung und Charakterisierung von AP-B und NRDC**

#### **3.4.1 Dissoziation des Peptidase-Komplexes aufgrund unterschiedlicher Salzkonzentrationen**

Um den AP-B-NRDC-Komplex aus den hoch-molekularen Fraktionen des Glycerolgradienten (Abb.3.3) zu isolieren, wurden die Fraktionen 6-12 vereint und mittels eines Natriumchloridgradienten in der DEAE-Anion-Austausch-Chromatographie der Ladung nach getrennt. Die Proteine wurden durch einen linearen Salzgradienten eluiert und in 500 µl Fraktionen aufge-

fangen. Das fraktionierte Eluat wurde auf die Peptidase Aktivitäten durch Messungen mit den fluorogenen Peptidsubstraten geprüft. Hierzu wurde für AP-B das Substrat H-Arg-AMC und für NRDC das ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> verwendet. Anschliessend wurden die Fraktionen im Immunoblot analysiert (**Abb.3.6**).



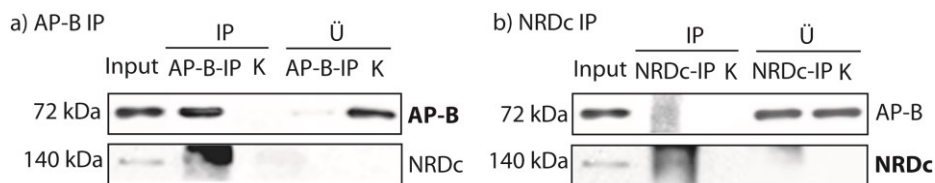
**Abb. 3.6 DEAE Anionen-Austausch-Chromatographie zur Aufreinigung der Peptidasen aus den Fraktionen 6-12 der Glycerolgradientenfractionierung.** Die Fraktionen 6-12 der Glycerolgradientenfractionierung wurden vereint, auf eine DEAE Anion-Austauscher Säule geladen und mit einem Natriumchlorid (NaCl) Gradienten eluiert. Das Eluat wurde in 500 µl Fraktionen gesammelt. a) Aktivitätsbestimmung von AP-B und NRDC in den einzelnen Fraktionen mittels fluorogener Peptidsubstrate (schwarzer Graph). Für AP-B wurde 1 µM des Substrates H-Arg-AMC und für NRDC 2 µM ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> verwendet. NaCl Gradient (grauer Graph). b) Immunoblotanalyse der einzelnen Fraktionen mit dem AP-B und NRDC Antikörper.

Die Darstellung der photometrisch gemessenen Aktivitäten in **Abb.3.6a** zeigt, dass die stärkste AP-B Aktivität in den Fraktionen A6-B3 detektiert wurde. Für NRDC wurden hingegen zwei Aktivitätspeaks gemessen. Ein Peak wurde in den Fraktionen A8-B3 detektiert und ein weiterer, mit verstärkter NRDC Aktivität, in den Fraktionen B8-C5. Die Immunoblotanalyse in **Abb.3.6b** verifiziert das Ergebnis der Aktivitätstests. Der AP-B Antikörper detektierte die stärksten AP-B-Signale in den Fraktionen A6-B3. Im Gegensatz dazu kam NRDC überwie-

gend in den Fraktionen B8-C5 vor. Zusätzlich wurden in den Fraktionen A8-B3 mittels des NRDC Antikörpers schwächere Proteinbanden, jedoch mit einem geringfügig erhöhten Molekulargewicht verglichen mit dem von NRDC, detektiert. Durch das größere Molekulargewicht dieser Proteinbanden, detektiert durch den NRDC-Antikörper, ist unklar, ob es sich um eine modifizierte Form von NRDC handelt oder um eine unspezifische Kreuzreaktion des Detektions-Antikörpers. Damit deutet die Detektion von AP-B und NRDC in unterschiedlichen Fraktionen nach der DEAE-Chromatographie darauf hin, dass es vermutlich aufgrund der erhöhten NaCl-Konzentration in der Chromatographie überwiegend zur Dissoziation der Peptidasen aus dem AP-B-NRDC-Komplex kam. Um die Frage zu klären, ob es sich bei dem detektierten NRDC-Signal mit erhöhtem Molekulargewicht in der Immunoblotanalyse, das zusammen mit AP-B in den Fraktionen A8-B3 ko-eluiert, um eine modifizierte Form von NRDC handelt oder um eine unspezifische Kreuzreaktion des Detektions-Antikörpers, wurden im Folgenden Immunpräzipitations-Analysen durchgeführt.

### 3.4.2 AP-B interagiert nicht mit NRDC in den Fraktionen der DEAE-Chromatographie

Um eine heteromere Komplexbildung in den Fraktionen A8-B4 der DEAE-Chromatographie nachzuweisen, wurden die Fraktionen vereint und mit AP-B oder NRDC Antikörper immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden anschliessend mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot analysiert (**Abb.3.7**).



**Abb. 3.7) Ko-Immunpräzipitation von AP-B und NRDC aus Fraktionen der DEAE-Chromatographie.** Die Fraktionen A8-B4 der DEAE-Chromatographie wurden vereint und jeweils mit AP-B (a) oder NRDC (b) Antikörper inkubiert. Anschliessend wurden die Immunpräzipitationen mit den angegebenen Antikörpern im Immunoblot analysiert. IP=Immunpräzipitation; Ü=Überstand; K=Kontrolle mit Prä-Immunserum

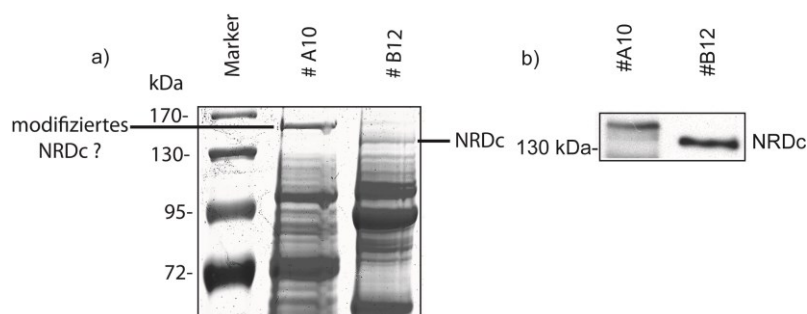


Die Analyse zeigt, dass AP-B effizient präzipitiert werden konnte, da in den Überständen kein AP-B nachweisbar war (**Abb.3.7a**). Die Immunpräzipitation mit dem NRDC Antikörper hingegen führte zu keiner ausreichenden Präzipitation, wobei bereits im Input bzw. in der Kontrolle des Überstandes NRDC im Immunoblot nur schwach, bzw. kein Signal, detektiert werden konnte (**Abb.3.7b**). Somit war eine Ko-Immunpräzipitation nicht eindeutig nachweisbar, so dass die Peptidasen in den Fraktionen der DEAE-Chromatographie wahrscheinlich nicht interagieren.

Zudem ist weiterhin unklar, ob es sich tatsächlich um die Endopeptidase NRDC in den DEAE Fraktionen A8-B4 handelt. Um dies zu untersuchen wurden im nächsten Abschnitt massenspektrometrische Analysen der unterschiedlichen DEAE-Fraktionen durchgeführt.

### **3.4.3 Die massenspektrometrische Analyse verifiziert NRDC in der Fraktion B12 der DEAE-Chromatographie und bestätigt die Dissoziation des Peptidase-Komplexes**

In der vorangegangenen DEAE-Chromatographie konnten mittels Immunoblot-Analyse zwei verschiedene NRDC-Formen detektiert werden, die sich in ihrer molekularen Größe und dem Elutionsverhalten unterscheiden, jedoch eine gleiche Substratspezifität aufweisen. Um zu untersuchen, ob es sich bei der höher-molekularen Form um NRDC handelt oder um eine unspezifische Kreuzreaktion des Detektions-Antikörpers, wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die Fraktionen A10 und B12 der DEAE-Chromatographie in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie angefärbt (**Abb.3.8a**). Die Proteinbanden, die NRDC entsprechen könnten, wurden mittels des spezifischen NRDC Antikörpers in der Immunoblotanalyse detektiert (**Abb.3.8b**). Die korrelierenden Proteinbanden wurden aus dem Coomassie-Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (**Tab.3.1**).



**Abb 3.8 Coomassie gefärbtes SDS-Gel zur massenspektrometrischen Analyse der NRDC Protein-Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht.** Die Fraktionen A10 und B12 aus der DEAE Chromatographie (siehe Abb.3.4) wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Die korrelierenden NRDC-Banden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. b) Verifizierung der detektierten Protein-Banden mittels Immunoblotanalyse mit dem NRDC Antikörper.

Rank	Status	Accession No	Protein Name	Mascot Score	MW	pI	No of Peptides Matched	Sequence Coverage
1	signifikant	NRDC_HUMAN	O43847 NRDC_HUMAN Nardilysin	1898	131488	4,9	23	17

**Tab. 3.1 Massenspektrometrische Analyse der NRDC Protein-Bande bei ~140 kDa in der Fraktion #B12 der DEAE-Chromatographie.** Die DEAE-Fraktion #B12 wurde in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die aufgrund des Molekulargewichtes mit NRDC korrelierende Proteinbande wurde ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. MW=Molekulargewicht; pI= Isoelektrischer Punkt.

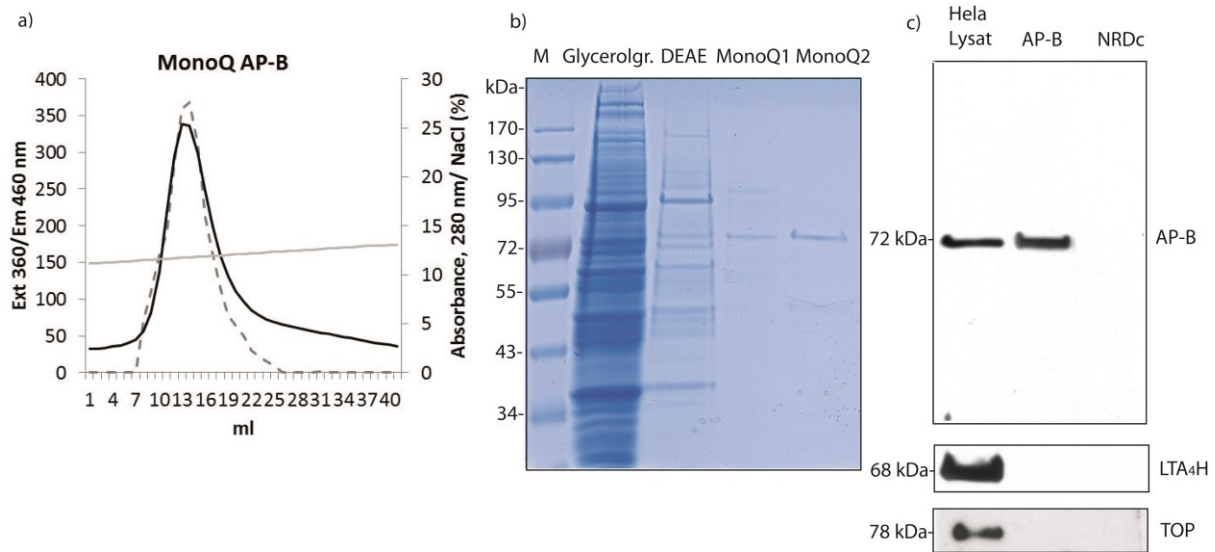
Durch die massenspektrometrische Analyse konnte NRDC eindeutig in der Fraktion B12 identifiziert werden (**Tab.3.1**). NRDC wurde jedoch nicht in der Fraktion A10 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), wodurch das Substrat ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> in den entsprechenden DEAE-Fractionen vermutlich durch die Aktivität anderer Peptidasen umgesetzt wird. Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse macht somit deutlich, dass es aufgrund der unterschiedlichen molekularen Eigenschaften zur Dissoziation des AP-B-NRDC-Komplexes in dem vorherigen Experiment der DEAE-Chromatographie gekommen ist. Somit liegen die beiden Peptidasen in unterschiedlichen Fraktionen der DEAE-Chromatographie vor, die zur weiteren Aufreinigung genutzt werden können (Abschnitt 3.4.4).

---

### 3.4.4) Aufreinigung von AP-B und NRDC aus den Fraktionen der DEAE-Chromatographie

Zur Aufreinigung von AP-B wurden die Fraktionen A6-B4 der DEAE-Anion-Austausch-Chromatographie vereint, mit Puffer verdünnt und in der MonoQ-Anionen-Austausch-Chromatographie mittels eines linearen dreistufigen NaCl Gradienten von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen aufgefangen und die Absorption bei 280 nm detektiert. Anschliessend konnte die AP-B-Aktivität in den einzelnen Fraktionen mittels des fluorogenen Peptidsubstrates photometrisch gemessen werden. Hierzu wurde jeweils 1  $\mu$ M des Substrates H-Arg-AMC verwendet (**Abb.3.9a**). Die Fraktion mit der stärksten AP-B-Aktivität wurde in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Coomassie angefärbt (**Abb.3.9b**).

Die Coomassie-Färbung präsentierte eine prominente Bande bei einem Molekulargewicht von 72 kDa, die AP-B entspricht (**Abb.3.9b MonoQ1**). Weiterhin sind jedoch verschiedene Verunreinigungen innerhalb der MonoQ1-Fraktion zu erkennen. Deshalb wurden die MonoQ-Fraktionen mit der stärksten AP-B Aktivität vereint, mit Puffer verdünnt und nochmal mittels des gleichen linearen dreistufigen NaCl-Gradienten von der MonoQ-Säule eluiert (**Abb.3.9a**). Die Fraktion mit der stärksten Aktivität wurde wiederum in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und Coomassie gefärbt (**Abb. 3.9b, MonoQ2**). In der Coomassie-Färbung der MonoQ2-Fraktion konnte wieder die prominente AP-B-Proteinbande bei 72 kDa detektiert werden. Des Weiteren sind in der Abbildung der Coomassie-Färbung kaum Verunreinigungen der AP-B Probe zu erkennen.



**Abb.3.9 Aufreinigung von AP-B mittels mehrerer MonoQ-Anion-Austausch-Chromatographie-Schritte.** Die Fraktionen A6-B12 der DEAE-Chromatographie wurden vereint und über einen NaCl Gradienten in der MonoQ-Chromatographie getrennt (MonoQ5/50GL-Säule). Das Eluat wurde anschliessend in 500 µl Fraktionen gesammelt und die AP-B-Aktivität mit dem H-Arg-AMC Substrat bestimmt (a). Der durchgängige, schwarze Graph stellt die Absorption bei 280 nm dar und der gestrichelte graue Graph die AP-B-Aktivität. b) SDS-Gelelektrophorese mit anschliessender Coomassie-Färbung der unterschiedlichen Aufreinigungsschritte; Glycerolgr.=Glycerolgradientenfractionierung; DEAE= DEAE Chromatographie Fraktion; MonoQ1 und MonoQ2= Fraktionen der MonoQ Chromatographien; M= Molekularer Marker. c) Immunoblotanalyse des Zelllysates und der Aufreinigung mit dem AP-B, LTA<sub>4</sub>H und TOP Antikörper.

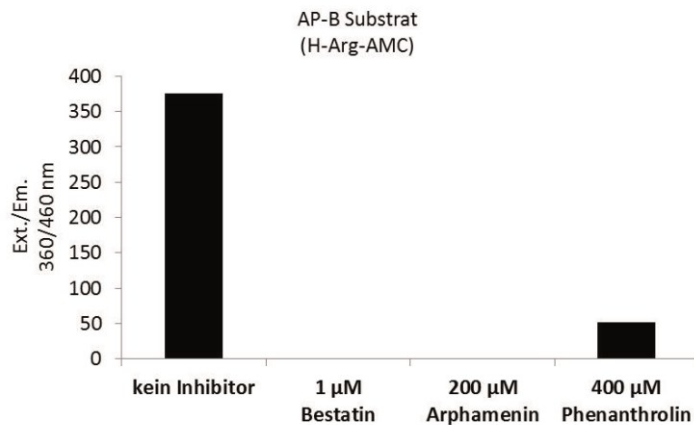
Die Abbildung der Coomassie Färbung zeigt aufgereinigte AP-B bei dem Molekulargewicht von 72 kDa nach der zweiten Elution von der MonoQ-Säule (**Abb.9b, MonoQ2**). Mittels Immunoblotanalyse konnte die Peptidase mit dem AP-B Antikörper nachgewiesen werden (**Abb.3.9c**). Da AP-B annähernd das gleiche Molekulargewicht wie die nah verwandte Aminopeptidase LTA<sub>4</sub>H aufweist sowie ein ähnliches Molekulargewicht wie die Peptidase TOP, wurde die AP-B Probe im Immunoblot zusätzlich mit den LTA<sub>4</sub>H und TOP Antikörpern analysiert. Das Ergebnis zeigte, dass die Peptidasen LTA<sub>4</sub>H und TOP nach der Aufreinigung nicht in der AP-B Probe nachgewiesen werden konnten.

Zur Verifizierung der Peptidase AP-B wurde die 72 kDa Protein-Bande aus dem Coomassie-Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (**Tab.3.2**). Hierdurch konnte zusätzlich bestätigt werden, dass es sich um die Peptidase AP-B handelte.

Rank	Status	Accession No	Protein Name	Mascot Score	MW	pI	Sequence Coverage	No of Peptides Matched
1		AMPB_HUMAN	Q9H4A4 AMPB_HUMAN Aminopeptidase B	2139	72549	5,5	47	29

**Tab. 3.2 Massenspektrometrische Analyse der Proteinbande bei 72 kDa nach der AP-B-Aufreinigung.** Nach der Aufreinigung von AP-B wurde die Probe in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die 72 kDa Proteinbande, die AP-B im Immunoblot entspricht, wurde ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. MW=Molekulargewicht; pI= Isoelektrischer Punkt

Zur Untersuchung des spezifischen Schnittverhaltens der aufgereinigten Peptidase wurde die Probe mit den Aminopeptidase-Inhibitoren Bestatin und Arphamenin sowie mit dem Metallopeptidase-Inhibitor Phenanthrolin inkubiert. Das modifizierte Dipeptid Bestatin zählt zu den kompetitiven Inhibitoren verschiedener Aminopeptidasen wie z.B. AP-B, LTA<sub>4</sub>H und LAP (Muskardin et al, 1994; Umezawa et al, 1976). Arphamenin wurde aus *Chromobacterium violaceum* isoliert und ist ein ausschliesslich AP-B spezifischer, kompetitiver Inhibitor (Umezawa et al, 1983). Der Metallopeptidase Inhibitor Phenanthrolin gehört zu den polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und wirkt als ein Chelator, wobei es dem Enzym Metallionen, wie z.B. Zink bei AP-B oder NRDC, entzieht (Felber et al, 1962). Nach der Inkubation mit den Inhibitoren wurde die AP-B-Aktivität mittels der Umsetzung des fluorogenen Peptidsubstrates H-Arg-AMC photometrisch gemessen und graphisch dargestellt (**Abb.3.10**). Erwartungsgemäß wurde AP-B durch die Inhibitoren Bestatin und Arphamenin in ihrer Aktivität vollständig gehemmt, so dass kein Substratumsatz gemessen werden konnte. Zudem wurde die AP-B-Aktivität durch Phenanthrolin aufgrund des Entzugs der Zink-Ionen deutlich reduziert.

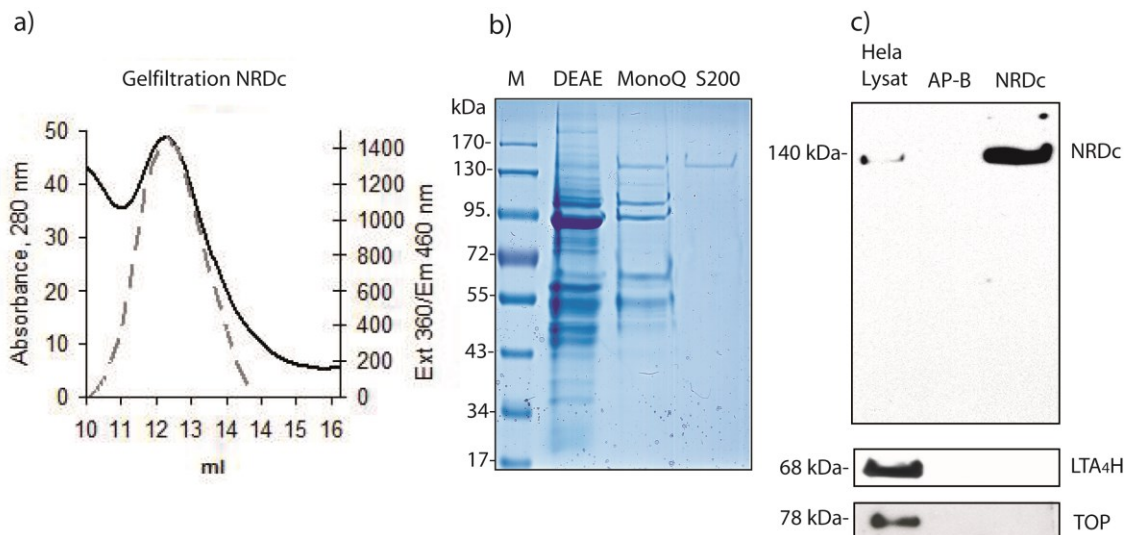


**Abb. 3.10 Inhibition der AP-B Aktivität.** Aus HeLa-Zellen aufgereinigte AP-B wurde mit den Inhibitoren Bestatin, Arphamenin und Phenanthroline in den angegebenen Mengen für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die AP-B Aktivität mittels des fluorogenen Substrates H-Arg-AMC photometrisch gemessen.

Zur Aufreinigung von NRDC wurden die Fraktionen B8-C4 aus der DEAE-Chromatographie vereint und in der MonoQ-Anionen-Austausch-Chromatographie mittels eines linearen dreistufigen NaCl-Gradienten der Ladung nach getrennt. Das Eluat wurde in Fraktionen aufgefangen und die Absorption bei 280 nm detektiert. Anschließend konnte die NRDC Aktivität in den einzelnen Fraktionen mittels des fluorogenen Peptidsubstrates photometrisch gemessen werden. Hierzu wurden jeweils 2 µM des Substrates ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> verwendet (Daten nicht gezeigt). Die Fraktion mit der stärksten NRDC-Aktivität wurde in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Coomassie angefärbt (**Abb.3.11**).

Das Ergebnis der Coomassie-Färbung in **Abb.3.11b, MonoQ** zeigt eine Protein-Bande bei einem Molekulargewicht von 140 kDa, die NRDC entspricht. Jedoch waren noch andere prominente und teilweise niedermolekulare Proteine in der NRDC-Fraktion nach der MonoQ-Chromatographie vorhanden. Um diese Verunreinigungen aus der NRDC-Probe zu entfernen, wurde in einem folgenden Schritt eine Gelfiltration über eine Superdex 200 Säule durchgeführt. Hierfür wurde die MonoQ-Fraktion mit der stärksten proteolytischen Aktivität eingesetzt. Nach der Gelfiltration wurde das Eluat fraktioniert, die Absorption bei 280 nm gemessen und die NRDC Aktivität in den einzelnen Fraktionen mittels des fluorogenen Peptidsubstrates photometrisch bestimmt (**Abb. 3.11a**). Die Proteine der Fraktion mit der stärksten proteolytischen Aktivität wurden in der SDS-Gelelektrophorese analysiert und mit

Coomassie gefärbt (**Abb.3.11b**, **S200**). In der Abbildung der Coomassie-Färbung ist wieder die prominente Proteinbande bei dem Molekulargewicht von 140 kDa zu erkennen, die NRDC entspricht. Zudem wurden kaum Verunreinigungen nach der Gelfiltration detektiert. Schliesslich wurde die aufgereinigte NRDC-Probe im Immunoblot analysiert (**Abb.3.11c**). NRDC konnte durch den spezifischen Antikörper nach der Aufreinigung detektiert werden.



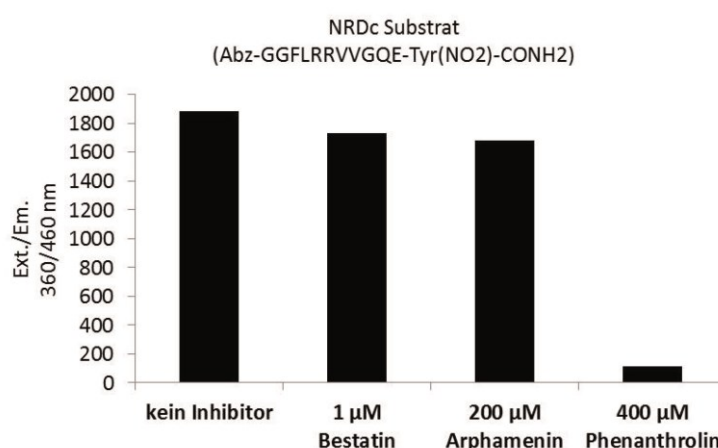
**Abb.3.11 Aufreinigung von NRDC in der MonoQ-Chromatographie mit anschliessender Gelfiltration.** Die Fraktionen A6-B12 der DEAE-Chromatographie wurden vereint und mittels eines NaCl Gradienten in der MonoQ-Chromatographie getrennt (MonoQ5/50 GL Säule). a) Die MonoQ-Fraktion mit der stärksten NRDC Aktivität wurde durch Gelfiltration über eine S200 Säule nach dem Molekulargewicht eluiert. Das Eluat wurde im Anschluss fraktioniert und die Aktivität von NRDC mittels des fluorogenen Substrates ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> bestimmt. Der durchgängige, schwarze Graph stellt die Absorption bei 280 nm dar und der gestrichelte, graue Graph die NRDC Aktivität. b) SDS-Gelelektrophorese mit anschliessender Coomassie-Färbung der unterschiedlichen Aufreinigungsschritte; DEAE= DEAE Chromatographie Fraktion; MonoQ= Fraktion der MonoQ Chromatographie; S200= Fraktion nach Gelfiltration mittels der S200 Säule; M= Molekularer Marker. c) Immunoblotanalyse des Zelllysates und der Aufreinigung mit dem NRDC, LTA<sub>4</sub>H und TOP Antikörper.

Zur Verifizierung der Endopeptidase NRDC wurde die 140 kDa Proteinbande aus dem Coomassie-Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (**Tab.3.3**). Hierdurch konnte eindeutig bestätigt werden, dass es sich um die Peptidase NRDC handelte.

Rank	Status	Accession No	Protein Name	Mascot Score	MW	pI	No of Peptides Matched	Sequence Coverage
1	signifikant	NRDC_HUMAN	O43847 NRDC_HUMAN Nardilysin	3366	131488	4,9	47	29

**Tab. 3.3 Massenspektrometrische Analyse des aufgereinigten NRDC.** Nach der Aufreinigung von NRDC durch DEAE-Chromatographien und Gelfiltration wurde die Probe in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die 140 kDa Proteinbande, die NRDC im Immunoblot entspricht, wurde ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. MW=Molekulargewicht; pI=Isoelektrischer Punkt

Zur Untersuchung des spezifischen Schnittverhaltens der aufgereinigten Endopeptidase wurde die Probe analog zu AP-B mit den Amino-peptidase-Inhibitoren Bestatin und Arphamenin und dem Metallopeptidase-Inhibitor Phenanthrolin inkubiert. Anschliessend wurde die NRDC Aktivität mit Hilfe des fluorogenen Peptidsubstrates ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> gemessen (**Abb.3.12**). Erwartungsgemäß wurde die NRDC-Aktivität nicht durch die Amino-peptidase-Inhibitoren Bestatin und Arphamenin gehemmt und der Substratumsatz entsprach dem der Probe ohne Inhibitor. Andererseits wurde die Metallopeptidase Aktivität von NRDC durch Phenanthrolin aufgrund des Entzugs der Zink-Ionen deutlich reduziert (**Abb.3.12**).



**Abb. 3.12 Inhibition der NRDC Aktivität.** Aus HeLa-Zellen aufgereinigtes NRDC wurde mit den Inhibitoren Bestatin, Arphamenin und Phenanthrolin in den angegebenen Mengen für 60 Minuten Inkubiert. Anschliessend wurde die NRDC Aktivität mittels des fluorogenen Substrates ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> photometrisch gemessen.



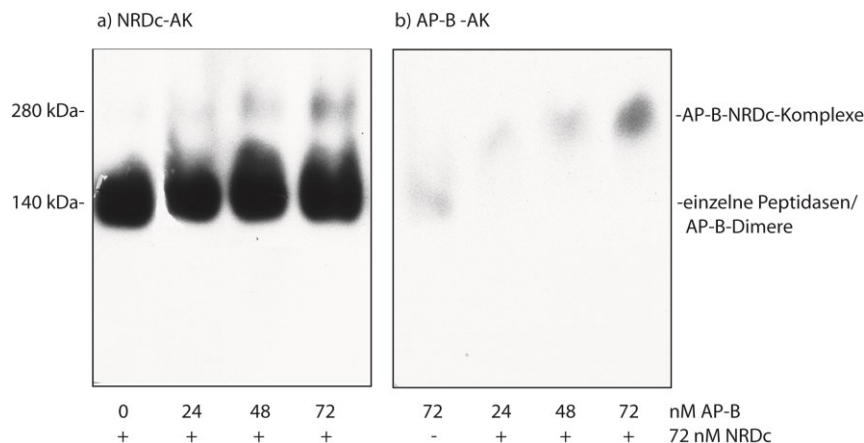
Die aus HeLa-Zellen aufgereinigten Peptidasen AP-B und NRDC standen nun in hoher Reinheit und mit spezifischer Funktionalität für weitere Experimente bereit. Es sollte nun die *in vitro* Komplex Rekonstitution der Peptidasen und eine dadurch bedingte Beeinflussung der spezifischen Enzymaktivitäten untersucht werden.

### **3.5 Die *in vitro* AP-B-NRDC Komplex Rekonstitution führt zu einer Aktivitätssteigerung beider Enzyme**

Durch die vorangegangenen Immunpräzipitations-Experimente konnte die Assoziation von AP-B und NRDC nachgewiesen werden. Der Peptidase-Komplex sollte nun *in vitro* aus den zuvor aufgereinigten Peptidasen rekonstituiert werden, um vergleichende Analysen bezüglich der enzymatischen Aktivitäten durchführen zu können.

#### **3.5.1 Unterschiedliche Migration der Peptidasen AP-B und NRDC und des *in vitro* generierten Komplexes in der Nativ-Gelelektrophorese**

Zur Analyse der *in vitro* Komplex-Rekonstitution wurden die aufgereinigten Peptidasen AP-B und NRDC sowie Ansätze mit beiden Peptidasen zusammen für 30 Minuten inkubiert und in der Nativ-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Migration der Proteine im Nativ-Gel wurde anschliessend im Immunoblot mittels der AP-B und NRDC Antikörper analysiert (**Abb.3.13**).



**Abb. 3.13 Nativ-Gelelektrophorese des *in vitro* rekonstituierten AP-B-NRDc-Komplexes.** Die Peptidasen AP-B und NRDc sowie die in angegebenen Mengen kombinierten Peptidasen wurden in einem 3,5-12 prozentigen Nativ-Gradienten-Gel aufgetrennt. Anschliessend wurden die Peptidasen in der Immunoblotanalyse mit dem NRDc (a) oder AP-B (b) Antikörper detektiert.

Anhand der Migration der Proteine in der Nativ-Gelelektrophorese und ihrer Detektion im Immunoblot ist zu erkennen, dass NRDc überwiegend bei einem Molekulargewicht von 140 kDa migrierte (**Abb.13a**). Damit lag NRDc als Monomer nach der Aufreinigung vor. Durch die Zugabe einer steigenden Menge AP-B wurde zunehmend eine Proteinbande bei einem Molekulargewicht von 280 kDa detektiert. Dabei handelte es sich vermutlich um die Assoziation von NRDc und AP-B zu einem höher-molekularen Komplex, wobei nur ein kleiner Anteil des NRDc zu dem Komplex interagierte.

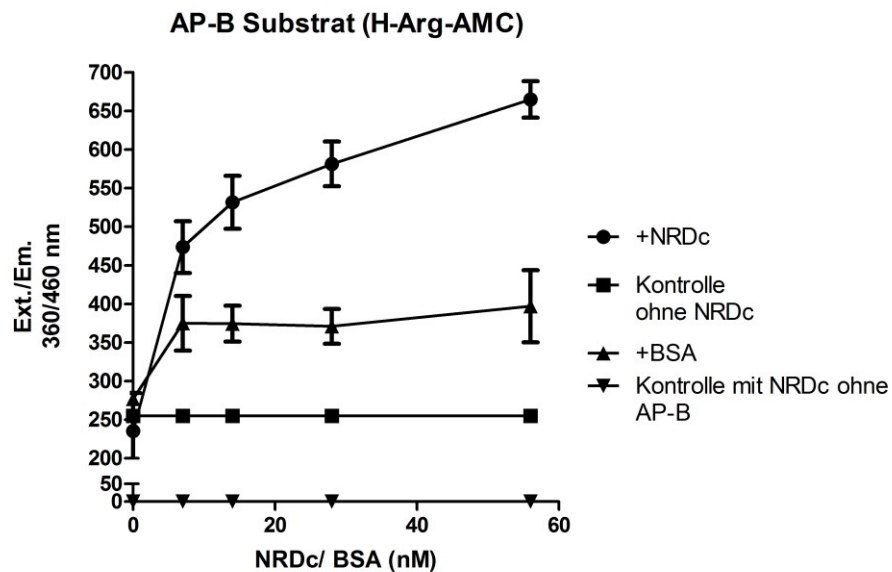
AP-B wurde zuerst ohne die Zugabe von NRDc bei einem Molekulargewicht von 140 kDa detektiert (**Abb.3.13b**). Dieses Molekulargewicht unterscheidet sich von dem des Monomeren AP-B mit 72 kDa und bedeutet, dass AP-B nach der Aufreinigung überwiegend als Dimer vorlag. Nach der Zugabe von steigenden Mengen NRDc zu AP-B kam es zu einer veränderten Migration der Proteine in der Nativ-Gelelektrophorese. AP-B wurde nun ebenfalls bei einem Molekulargewicht von 280 kDa detektiert. Dies zeigt, dass es zur *in vitro* Rekonstitution des AP-B-NRDc-Komplexes kam, wobei ein Komplex mit einem Molekulargewicht von 280 kDa gebildet wurde. Zudem wurde, durch die Zugabe von NRDc, AP-B nicht mehr bei dem Molekulargewicht von 140 kDa in der Immunoblotanalyse detektiert. Demnach wurde AP-B im Gegensatz zu NRDc überwiegend in den höher-molekularen Komplex eingebaut.

Aufgrund der Migration der Peptidasen in der Nativ-Gelelektrophorese konnte außerdem eine Aussage über die Stöchiometrie des Komplexes getroffen werden. Es handelte sich demnach bei dem 280 kDa Peptidase-Komplex wahrscheinlich um ein Trimer, bestehend aus zwei Molekülen AP-B und einem Molekül NRDC.

### 3.5.2 Enzymatische Aktivierung von AP-B durch NRDC

Studien von Chow et al. zeigen einen gesteigerten Substratumsatz von mMDH durch die Interaktion mit NRDC (Chow et al, 2005). Aufgrund dieses Befundes wurde die Hypothese aufgestellt, dass die im vorausgehenden Experiment gezeigte *in vitro* Komplex-Rekonstitution von AP-B und NRDC eine interaktionsbedingte Aktivitätssteigerung von AP-B bewirkt.

Um dies zu testen, wurde zunächst der Einfluss von NRDC auf die Aktivität von AP-B überprüft. Dazu wurde eine steigende Menge NRDC zu einer konstanten Menge AP-B bei einem einheitlichen Gesamtvolumen hinzugegeben. Als Kontrolle wurde ebenfalls eine steigende Menge BSA mit AP-B vereint. 1  $\mu$ M des fluorogenen H-Arg-AMC-Substrates, das durch AP-B gespalten wird, wurde jeweils hinzugefügt und die Proben für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Ansätze photometrisch gemessen und graphisch dargestellt (**Abb.3.14**).

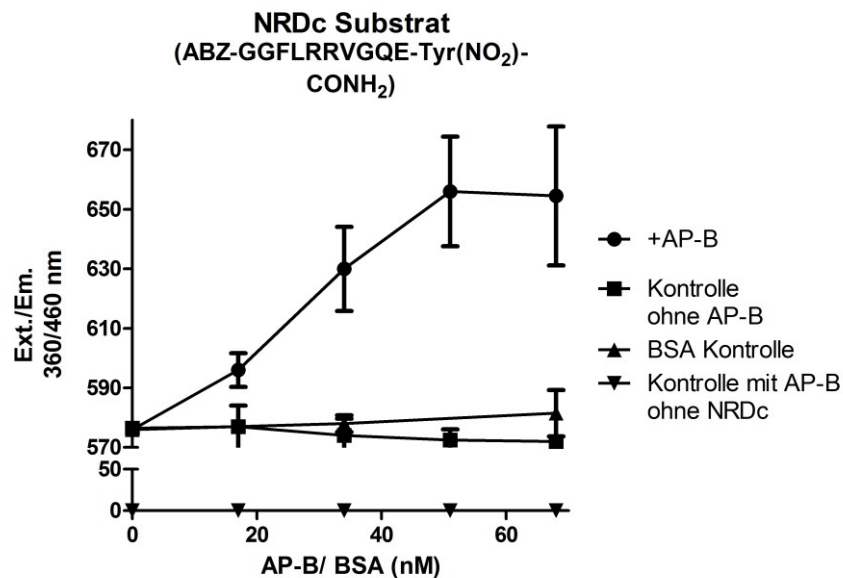


**Abb. 3.14 Aktivierung der AP-B-Aktivität durch NRDC.** Zu 72 nM AP-B wurde eine steigende Menge NRDC hinzugegeben und nach 120 Minuten Inkubation bei 37°C die AP-B Aktivität mittels des fluorogenen H-Arg-AMC Substrates gemessen (● „+NRDc“). Als Kontrolle wurde zu 72 nM AP-B eine steigende Menge BSA hinzugefügt (▲ „+BSA“). Zusätzlich zeigt die „Kontrolle ohne NRDC“ die basale AP-B-Aktivität (■). Die „Kontrolle mit NRDC ohne AP-B“ zeigt den Umsatz des H-Arg-AMC Substrates durch NRDC (▼). Durch vorausgehende Titrationsanalysen wurde ermittelt, dass eine Menge von 72 nM AP-B zusammen mit dem fluorogenen Peptidsubstrat für AP-B und einer entsprechenden Zugabe von NRDC zur deutlich messbaren Aktivitätssteigerung von AP-B führt.

Die **Abb.3.14** zeigt eine basale AP-B Aktivität von 250 in der „Kontrolle ohne NRDC“. Durch die Zugabe von steigenden Mengen NRDC („+NRDc“) ist ein Anstieg der AP-B-Aktivität von ~60% zu beobachten. NRDC allein bewirkte nicht die Umsetzung des H-Arg-AMC-Substrates („Kontrolle mit NRDC ohne AP-B“). In der BSA-Kontrolle kam es bis zu einer Menge von ~10 nM BSA zu einem geringen Anstieg der AP-B Aktivität von ~30% („+BSA“), wobei es sich wahrscheinlich um Stabilisierungseffekte handelt. Höhere BSA-Konzentrationen führten zu keiner weiteren Aktivierung von AP-B. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt somit, dass die vermehrte Zugabe von NRDC zu AP-B zu einer 60%igen Aktivitätssteigerung von AP-B führt. Demnach bewirkt die Interaktion von AP-B und NRDC die Steigerung der enzymatischen Aktivität von AP-B.

### 3.5.3 Enzymatische Aktivierung von NRDC durch AP-B

Es sollte nun untersucht werden, ob auch die NRDC Aktivität durch AP-B beeinflusst werden kann. Dementsprechend wurde das in Abschnitt 3.5.2 durchgeführte Experiment in reziproker Weise wiederholt. Zu einer konstanten Menge NRDC und 2  $\mu\text{M}$  des fluorogenen Abz-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub>-Substrates, das N-terminal des Aminosäurerestes Arginin durch NRDC gespalten wird, wurde eine steigende Menge AP-B hinzugegeben. Als Kontrolle wurden steigende Mengen BSA zu NRDC gegeben. Die Unterschiedlichen Ansätze wurden bei 37°C für 120 Minuten Inkubiert. Anschliessend wurde die Fluoreszenz der einzelnen Ansätze gemessen und graphisch dargestellt (Abb.3.15).



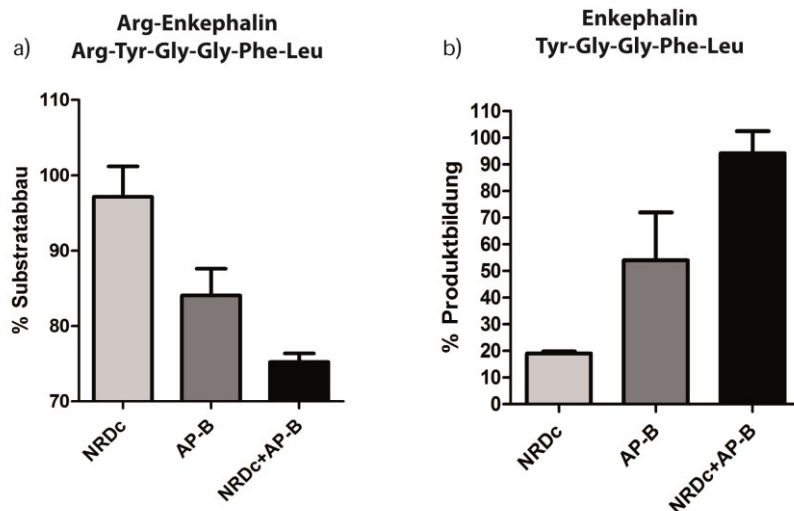
**Abb. 3.15 Aktivierung der NRDC Aktivität durch AP-B.** Zu 72 nM NRDC wurde eine steigende Menge AP-B hinzugegeben und nach 120 Minuten Inkubation bei 37°C die NRDC Aktivität mittels des fluorogenen Substrates ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> gemessen (● „+AP-B“). Als Kontrolle wurde zu 72 nM NRDC eine steigende Menge BSA hinzugefügt (▲ „+BSA“). Zusätzlich zeigt die „Kontrolle ohne AP-B“ die basale NRDC Aktivität (■). Die „Kontrolle mit AP-B ohne NRDC“ zeigt den Umsatz des ABZ-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> Substrates durch AP-B (▼). Durch vorausgehende Titrationsanalysen wurde ermittelt, dass eine Menge von 72 nM NRDC zusammen mit dem fluorogenen Peptidsubstrat für NRDC und einer entsprechenden Zugabe von AP-B zur deutlich messbaren Aktivitätssteigerung von NRDC führt.

Die Abb.3.15 zeigt, dass die NRDC Aktivitäten in der „Kontrolle ohne AP-B“ bei Werten von ~575 gemessen wurden. Die Zugabe von AP-B („+AP-B“) zu NRDC führte zu einem Anstieg

der NRDC-Aktivität um ca. 10%. In der „Kontrolle mit AP-B ohne NRDC“ konnte keine Aktivität gemessen werden, was bedeutet, dass AP-B nicht die Spaltung des NRDC Substrates Abz-GGFLRRVGQE-Tyr(NO<sub>2</sub>)-CONH<sub>2</sub> bewirkt. In der BSA-Kontrolle blieben die Werte konstant bei der basalen NRDC-Aktivität von ~575, weshalb die Zugabe von BSA auch bei steigender Menge zu keiner Beeinflussung der NRDC Aktivität führte. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, dass die vermehrte Zugabe von AP-B zu NRDC, wenn auch vergleichsweise gering, zu einer Aktivitätssteigerung von NRDC führt. Da jedoch in der *in vitro* Rekonstitution des AP-B-NRDC-Komplexes deutlich weniger NRDC als AP-B in den Komplex eingebaut wurde (Abb.3.16), handelt es sich ebenfalls um einen deutlichen Anstieg der NRDC Aktivität. Die Aktivität bezogen auf ein zum Komplex assoziierten NRDC Molekül erhöht sich demnach entsprechend. Damit bewirkt die Interaktion der beiden Enzyme nicht nur die Aktivierung von AP-B, wie in dem vorangegangenen Experiment gezeigt werden konnte, sondern auch die deutliche Aktivitätssteigerung von NRDC.

### **3.5.4 Der *in vitro* rekonstituierte AP-B-NRDC-Komplex prozessiert effektiv das Prohormon Arg-Enkephalin**

Die Aminopeptidase AP-B prozessiert das physiologisch relevante Prohormon Arg-Enkephalin (RYGGFL) durch die C-terminale Spaltung des Arginins (Hook et al, 2004). Um zu demonstrieren, dass es durch die Assoziation von AP-B mit NRDC zur verstärkten Substratumsetzung kommt, wurde das Prohormon Arg-Enkephalin mit dem Peptidase-Komplex und mit den aufgereinigten Peptidasen für 8 Stunden inkubiert. Anschliessend wurden die verschiedenen Ansätze mittels HPLC analysiert und das Ergebnis graphisch dargestellt (Abb.3.16).



**Abb. 3.16** Prozessierung des AP-B spezifischen Pro-Hormons Arg-Enkephalin durch den *in vitro* rekonstituierten Peptidase-Komplex. Prozessierung des Arg-Enkephalins (RYGGFL) mit NRDC (72 nM), AP-B (72 nM) und durch beide Peptidasen zusammen (72 nM AP-B und 72 nM NRDC) für 8 Stunden bei 37°C. Analyse der Prozessierungsansätze mittels HPLC. Darstellung des Substratabbaus (a) und der Enkephalin-Produktbildung (YGGFL) (b) in %.

Die schematische Darstellung der HPLC-Analyse der Arg-Enkephalin-Prozessierung zeigt, dass monomeres NRDC erwartungsgemäß kaum zu einem Substratabbau führte, da das Substrat annähernd vollständig nach der Inkubation mit NRDC vorhanden war (**Abb.3.16a**). Allein AP-B führte zu einem deutlichen Abbau des eingesetzten Arg-Enkephalin-Substrates. Durch die Inkubation von AP-B und NRDC zusammen mit dem Arg-Enkephalin-Substrat kam es zu einem deutlich gesteigerten Substratabbau gegenüber dem Ansatz mit AP-B. Das Ergebnis wird durch die Darstellung der Enkephalin-Produktbildung verifiziert (**Abb.3.16b**). Monomeres NRDC generierte kaum das Enkephalin-Produkt. AP-B und NRDC zusammen führten zu einer annähernd 50% gesteigerten Enkephalin-Bildung gegenüber AP-B. Das Ergebnis der Arg-Enkephalin-Prozessierung zeigt somit, dass analog zu dem vorangegangenen Experiment mit dem fluorogenen Peptidsubstrat auch hier ein gesteigerter Substratumsatz durch den AP-B-NRDC-Komplex gegenüber AP-B erreicht wird. NRDC prozessierte nur geringfügig das Substrat und trägt daher nur marginal zur Enkephalin-Produktbildung bei. Diese Daten bestätigen, dass die Assoziation von NRDC und AP-B zur Aktivitätssteigerung von AP-B führt.

### **3.6 Effiziente Prozessierung des HCMVpp65<sub>490-503</sub> (14mer) MHC-Klasse-I-Vorläuferpeptids durch den *in vitro* rekonstituierten Peptidase-Komplex**

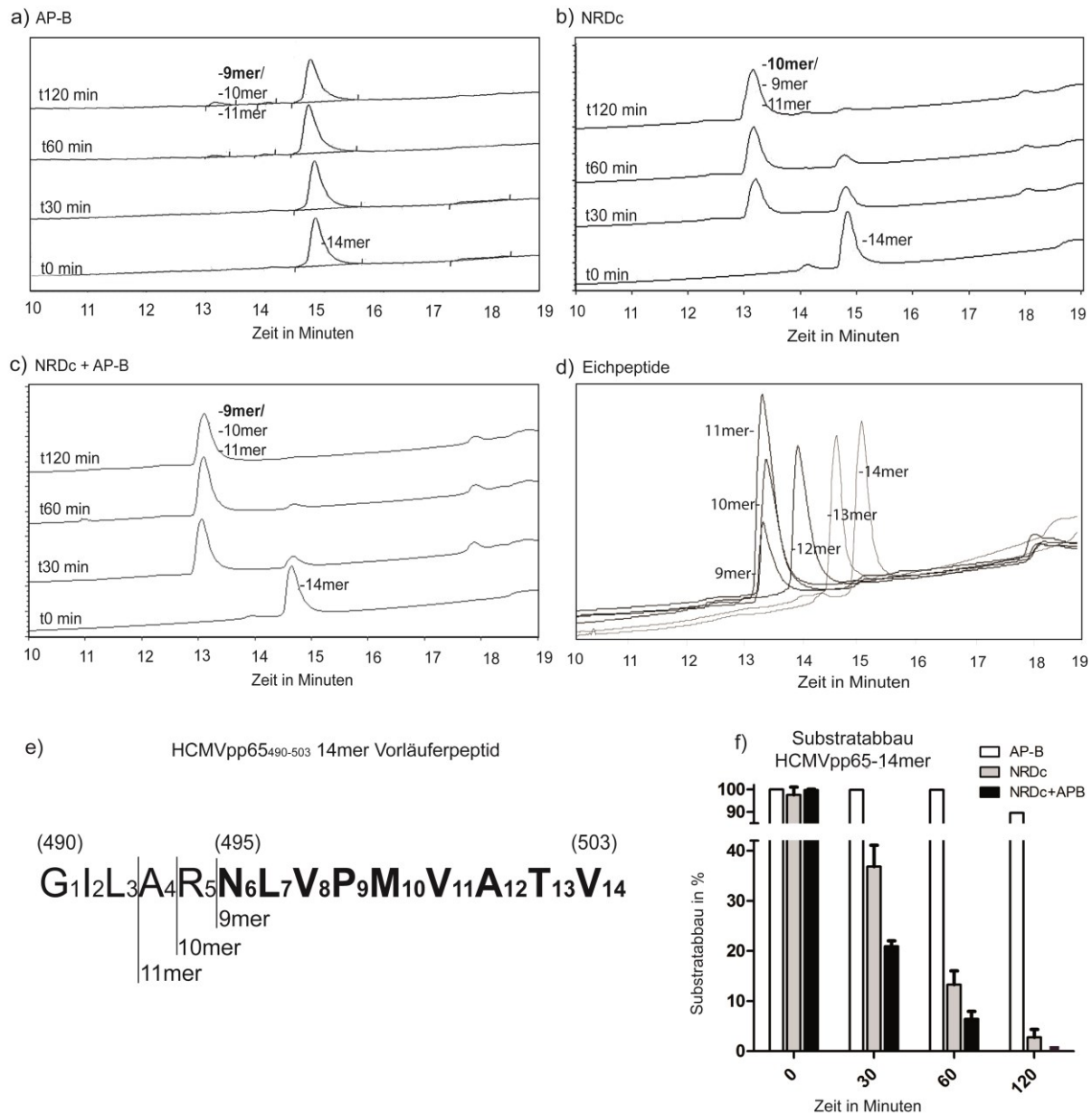
#### **3.6.1 Bildung der 9mer, 10mer und 11mer HCMVpp65-Peptide durch den AP-B-NRDc-Komplex**

Der in Abschnitt 3.2 durchgeführte CTL-Assay zeigte, dass AP-B und NRDc zusammen die Präsentation des HCMVpp65<sub>495-503</sub> Epitops deutlich reduzieren, da der siRNA-*knockdown* von AP-B und NRDc zur verstärkten pp65 Epitop-Präsentation führte. Demnach wurde die Hypothese aufgestellt, dass es durch die Interaktion von AP-B und NRDc zu einem verstärkten Abbau von HCMVpp65 Vorläuferpeptiden innerhalb des Zytosols kommt.

Da nun der *in vitro* rekonstituierte AP-B-NRDc Komplex vorlag, konnte diese Hypothese durch die Prozessierung eines HCMVpp65-Modellpeptids getestet werden. Hierbei wurde das proteasomal generierte HCMVpp65-14mer Peptid (pp65<sub>490-503</sub>, GILARNLVPMVATV) als Modellantigen für die Prozessierung durch die Peptidasen gewählt.

Demzufolge wurde das synthetisch hergestellte HCMVpp65-14mer Vorläuferpeptid mit den beiden aufgereinigten Peptidasen und mit dem *in vitro* rekonstituierten AP-B-NRDc-Komplex für verschiedene Zeiten inkubiert. Im Anschluss fand die Analyse der Prozessierungsansätze mittels HPLC statt (**Abb.3.17**). Zusätzlich wurden synthetisch hergestellte HCMVpp65-Referenzpeptide mit unterschiedlichen Längen als Marker zur Zuordnung der entstandenen HPLC-Peaks aufgetrennt.





**Abb. 3.17 HPLC-Analyse der HCMVpp65<sub>490-503</sub>-14mer Prozessierung durch AP-B und NRDC.** a) HPLC-Analyse der *in vitro* Prozessierung von 1 µg HCMVpp65-14mer Substrat mit a) 72 nM AP-B, b) 72 nM NRDC, c) 72 nM AP-B und 72 nM NRDC für die angegebenen Zeiten bei 37°C. d) HPLC-Profil der Referenzpeptide (Eichpeptide) 9mer, 10mer, 11mer, 12mer, 13mer und 14mer. Die HPLC-Trennung erfolgte mittels eines Acetonitrilgradienten von 10 bis 100 %. e) Sequenz des HCMVpp65-14mer Vorläuferpeptids. f) Schematischer Überblick des Substratabbaus in %.

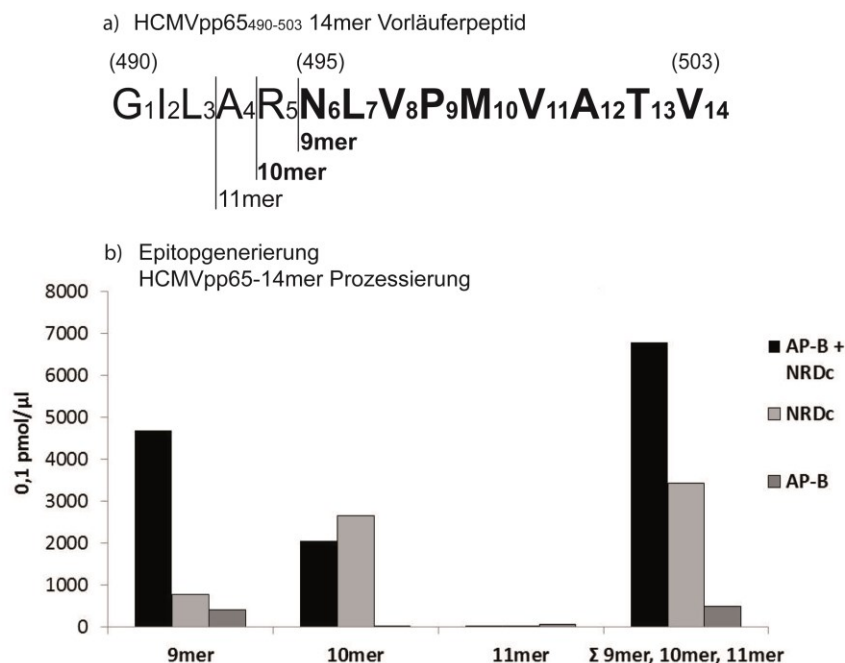
Das HPLC-Profil und die Analyse der Substratdegradation zeigen, dass AP-B scheinbar keinen Substratabbau des HCMVpp65-14mers nach 120 Minuten Inkubation aufwies

(Abb.3.17a, f). Das monomere NRDC hingegen baute das HCMVpp65-14mer Peptid ab, so dass nach 120 Minuten Inkubation nur noch ~4% des Substrates vorhanden waren (Abb.3.17b, f). AP-B und NRDC zusammen führten ebenfalls zu einem effizienten Substratabbau, der jedoch verstärkt ist gegenüber dem Abbau durch monomeres NRDC, da das Substrat nach 120 Minuten Inkubationszeit vollständig abgebaut war (Abb.3.17c, f). In der Abbildung der HPLC-Profile (Abb.3.17a, b, c) ist neben dem 14-mer Substratpeak ein weiterer prominenter Peak bei einer Retentionszeit von ~13 Minuten zu erkennen. Mittels der Referenzpeptide konnte ermittelt werden, dass es sich dabei um die entstandenen 9mer, 10mer und 11mer HCMVpp65 Produkte handelt, da das 12mer und das 13mer an anderer Stelle in der HPLC eluierten (Abb.3.17d). Auch kleinere Peptide, wie das 8mer und das 7mer, wiesen eine unterschiedliche Migration auf. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass durch den HCMVpp65-14mer Substratabbau in allen Ansätzen die 9mer, 10mer und 11mer Produkte entstanden sein können. Demnach kam es in dem HCMVpp65-14mer Vorläuferpeptid (GILARNLVPMVATV) wahrscheinlich zu Schnitten C-terminal des Aminosäurerestes Arginin (N<sub>6</sub>-V<sub>14</sub>), N-terminal des Aminosäurerestes Arginin (R<sub>5</sub>-V<sub>14</sub>) und N-terminal des Aminosäurerestes Alanin in Position 4 (A<sub>4</sub>-V<sub>14</sub>). Diese Schnitte können durch die beiden Peptidasen AP-B und NRDC sowie durch den rekonstituierten Komplex durchgeführt werden.

Das Ergebnis der HCMVpp65-14mer Prozessierung zeigt somit, dass NRDC und der AP-B-NRDC-Komplex verstärkt das 9mer Epitop und die 10mer- und 11mer-Produkte generieren und diese nicht degradieren. Dies steht im scheinbaren Widerspruch zu der aufgrund des CTL-Assays aufgestellten Arbeitshypothese, dass die Interaktion von AP-B und NRDC zu einem verstärkten Abbau von HCMVpp65 Vorläuferpeptiden und des 9mer Epitops führt. Für AP-B konnte nur ein sehr geringer Substratabbau und wenige 9mer, 10mer und 11mer Produkte beobachtet werden, die möglicherweise ebenso weiter degradiert werden könnten. Daher lässt sich für AP-B an dieser Stelle keine genaue Aussage über die Epitop-Generierung, bzw. einen Abbau treffen. Jedoch zeigten Prozessierungsexperimente mit längeren Inkubationszeiten von bis zu 8 Stunden auch die Generierung von 9mer, 10mer oder 11mer Peptiden durch AP-B (Daten nicht gezeigt). Weiterhin besteht jedoch Unklarheit, welche der drei entstandenen 9mer, 10mer und 11mer Prozessierungsprodukte durch den Abbau des HCMVpp65-14mers in welcher Menge durch die Peptidasen und den Peptidase-Komplex entstanden sind. Um diese Fragen zu klären, wurden in den folgenden Abschnitten massenspektrometrische Analysen der HCMVpp65-14mer Prozessierungsexperimente durchgeführt.

### 3.6.2 Verstärkte Bildung der 9mer HCMVpp65<sub>495-503</sub> Epitope durch den AP-B-NRDc-Komplex

Analog zu den vorangegangenen Experimenten der *in vitro* Prozessierung des HCMVpp65<sub>490-305</sub> 14mer Vorläuferpeptids wurden massenspektrometrische Analysen zum quantitativen Vergleich der entstandenen 9mer, 10mer und 11mer Produkte durchgeführt. Die Quantifizierung wurde auf diese drei Peptide beschränkt, da das 12mer und das 13mer nicht in der HPLC detektiert wurden (Abb.3.17d). Zur Quantifizierung der 9mer, 10mer und 11mer Prozessierungsprodukte wurden die entsprechenden synthetisch hergestellten Peptide in unterschiedlichen Mengen massenspektrometrisch analysiert und Titrationskurven mittels der gemessenen Intensitäten erstellt. Durch diese Titrationskurven konnten die genauen Konzentrationen der gebildeten 9mer, 10mer und 11mer Prozessierungsprodukte nach der massenspektrometrischen Analyse der Verdauansätze ermittelt und graphisch dargestellt werden (Abb. 3.18).

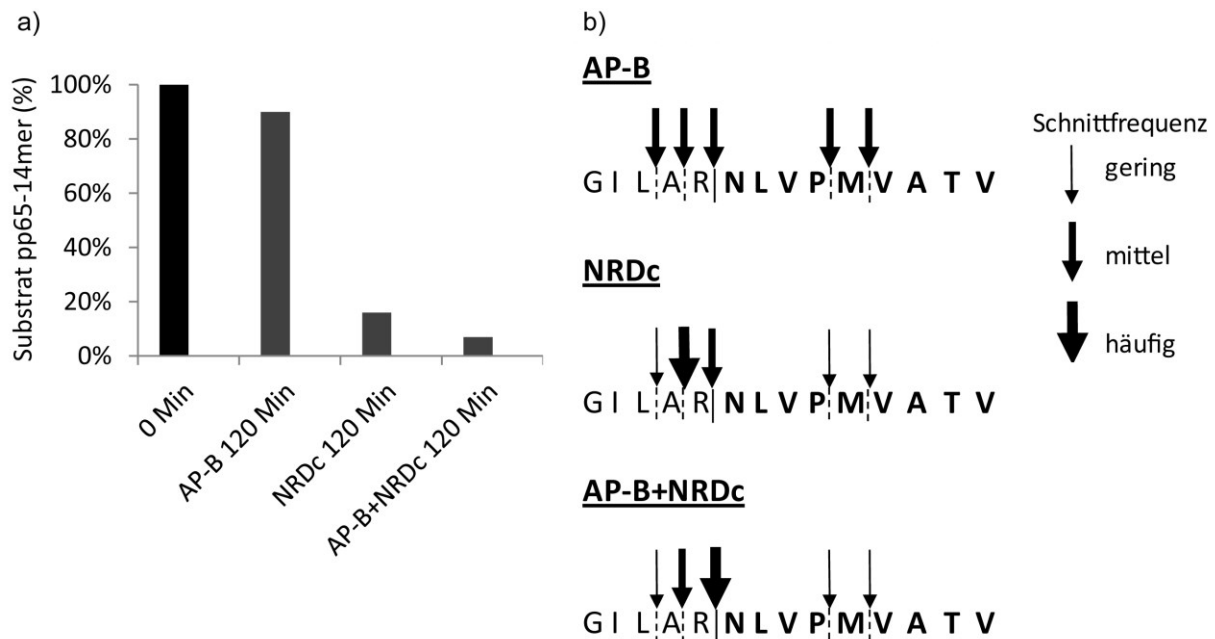


**Abb. 3.18 Massenspektrometrische Analyse der Epitop-Generierung durch AP-B und**

**NRDc.** Analyse der HCMVpp65<sub>490-305</sub> (14mer) Prozessierung durch AP-B und NRDc sowie durch den rekonstituierten Peptidase-Komplex. Die Ansätze wurden jeweils nach 120 Minuten Inkubation bei 37°C massenspektrometrisch analysiert. Weiterhin wurden die 9mer, 10mer und 11mer HCMVpp65-Referenzpeptide in unterschiedlichen Konzentrationen massenspektrometrisch analysiert und mittels der gemessenen Daten eine Titrationskurve erstellt. Anhand dieser Titrationskurve konnten die genauen Konzentrationen der analysierten Prozessierungsprodukte ermittelt werden. a) Sequenz des HCMVpp65<sub>490-305</sub> (14mer) Peptids. b) Schematische Darstellung des Ergebnisses der massenspektrometrischen Analyse.

In der **Abb.3.18** ist zu erkennen, dass der AP-B-NRDc-Komplex verstärkt das 9mer-Epitop (**N<sub>6</sub>-V<sub>14</sub>**) generiert und damit vermehrt Schnitte C-terminal des R<sub>494</sub> im HCMVpp65-14mer Peptid durchführt. Das 9mer-Epitop machte den größten Anteil innerhalb der Summe von 9mer, 10mer und 11mer Peptiden aus. Monomeres NRDC generierte hingegen verstärkt das 10mer (**R<sub>5</sub>-V<sub>14</sub>**) durch Schnitte N-terminal des R<sub>494</sub> im 14mer-Substrat. Dies ist in Übereinstimmung mit beschriebenen Schnittpräferenzen der Endopeptidase NRDC N-terminal von basischen Aminosäuren (Chesneau et al, 1996; Chow et al, 2003). Schnitte C-terminal des R<sub>494</sub> mit resultierender Epitop-Generierung wurden durch NRDC nur gering durchgeführt. Die weitere Auswertung der massenspektrometrischen Daten machte deutlich, dass AP-B wiederholt einen geringen Substratabbau nach 120 Minuten Inkubationszeit aufwies, jedoch durch N-terminales *Trimmen* des 14mer Peptids das Epitop in geringen Mengen generierte. Schnitte N-terminal des A<sub>493</sub> mit resultierendem 11mer-Produkt (**A<sub>4</sub>-V<sub>14</sub>**) wurden in allen Ansätzen in einer vernachlässigbar geringen Menge identifiziert. Das Resultat der massenspektrometrischen Quantifizierung zeigte somit, dass das optimale 9mer Epitop verstärkt durch den Peptidase-Komplex generiert wurde und das 10mer verstärkt durch NRDC.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die beschriebenen Schnittpräferenzen der Peptidasen AP-B und NRDC durch die Komplexbildung verstärkt werden und dies vermehrt zur Epitop-Generierung führt. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu der aufgrund der Ergebnisse des CTL-Assays aufgestellten Hypothese, dass AP-B und NRDC zusammen zu einem verstärkten Epitop-Abbau führen. Da möglicherweise in der HPLC-Analyse der HCMV-pp65-14mer Prozessierung der Epitop-Abbau nicht identifiziert wurde, wurden folgend die massenspektrometrisch detektierten Schnitte durchs Epitop in den unterschiedlichen Prozessierungsansätzen analysiert. Hierzu wurden die Schnitte innerhalb des Epitops massenspektrometrisch analysiert und mit den relativen Intensitäten der Epitop-Generierung verglichen und graphisch dargestellt (**Abb.3.19**).



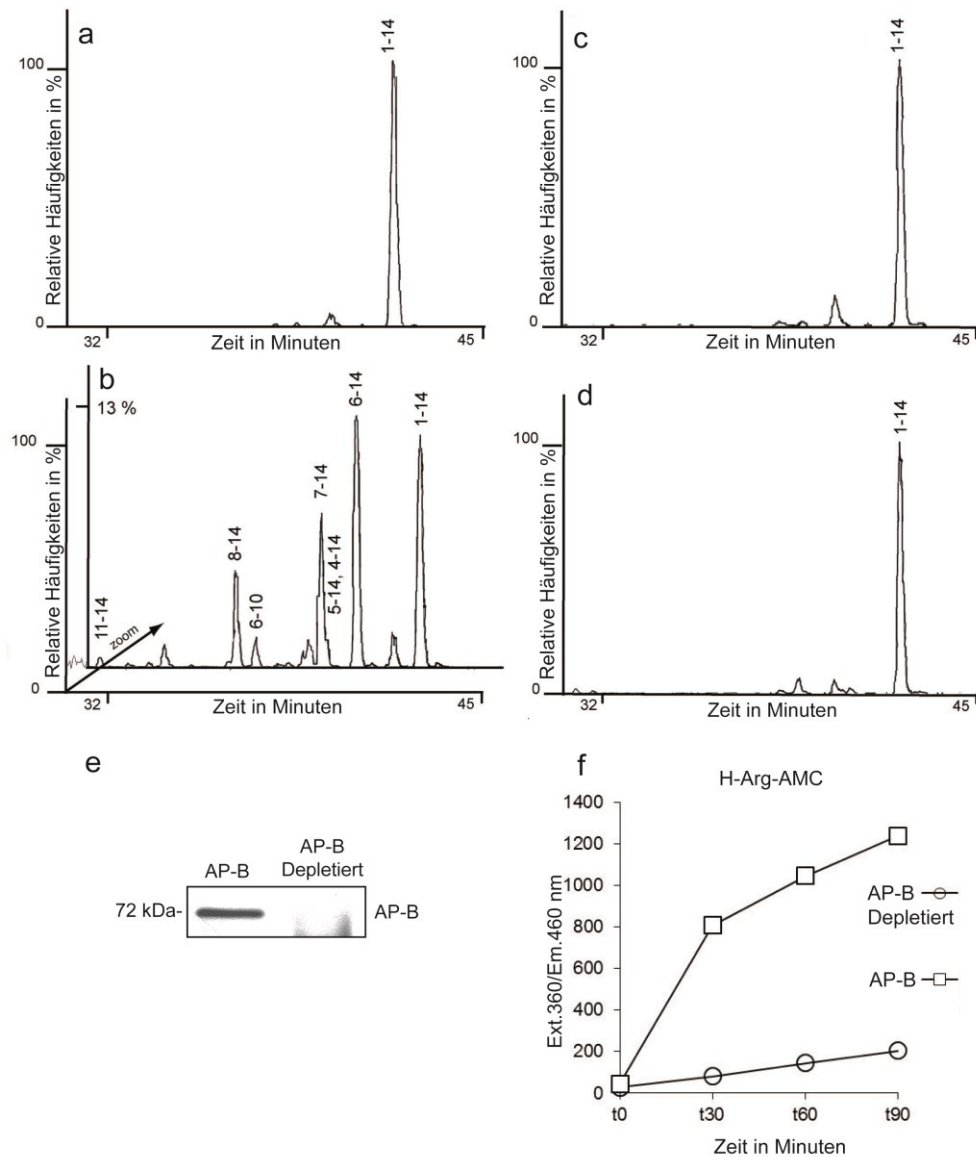
**Abb. 3.19 Vergleich der massenspektrometrischen Analysen der HCMVpp65<sub>495-503</sub> Epitop-Generierung mit der Zerstörung durch AP-B und NRDC sowie durch den AP-B-NRDC-Komplex.** 1 µg HCMVpp65<sub>490-503</sub> Peptid wurden mit 72 nM AP-B, 72 nM NRDC bzw. mit beiden Peptidasen gemischt (72 nM AP-B+72 nM NRDC) inkubiert, die Reaktion wurde nach 120 Minuten durch Zugabe von TFA gestoppt und die Verdauungsprodukte massenspektrometrisch analysiert. (a) Darstellung der massenspektrometrischen Analysen des prozentualen Substratabbaus durch AP-B, NRDC und AP-B+NRDC nach 120 Minuten Verdauzeit. (b) Die Aminosäuresequenz des 14mer Peptids wurde im Ein-Buchstaben-Code angegeben und das HLA-A2-restringierte CD8<sup>+</sup> T Zellepitop pp65<sub>495-503</sub> hervorgehoben. Die Schnittstellen wurden durch vertikale Linien gezeigt. Die Dicke der Pfeile veranschaulicht die Häufigkeit der Schnitte im 14mer Vorläuferpeptid nach 120 Minuten Inkubation (Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen wurde abgebildet.)

Die Darstellung der massenspektrometrischen Analyse in **Abb. 3.19** zeigt, dass bei der Prozessierung mit AP-B neben Schnitten C-terminal des R<sub>494</sub> mit resultierender Epitopbildung (N<sub>6</sub>-V<sub>14</sub>), Schnitte durch das Epitop C-terminal der Aminosäurereste Methionin und Prolin verstärkt vorkamen. Dies deutet darauf hin, dass die durch AP-B geringfügig gebildeten Epitope weiter abgebaut wurden, so dass AP-B vermutlich zur Degradation der Epitope beiträgt. Monomeres NRDC führte ebenfalls zu Schnitten innerhalb des Epitops C-terminal der Aminosäurereste Methionin und Prolin, jedoch war der Epitop-Abbau geringer als die Generierung. Die 9mer Epitop-Generierung durch den AP-B-NRDC-Komplex mit Schnitten C-terminal des R<sub>494</sub> war eindeutig verstärkt gegenüber der Prozessierung mit monomerem NRDC

bzw. AP-B. Zudem waren die detektierten Schnitte C-terminal der Aminosäurereste Methionin und Prolin innerhalb des Epitops gering. Damit zeigt der Vergleich der Epitop-Zerstörung mit der relativen Epitop-Generierung, dass NRDC und verstärkt der AP-B-NRDC-Komplex zu einer effektiven Bildung des HCMVpp65-9mer Epitops führte, das kaum weiter in kleinere Peptide prozessiert wurde. Im Gegensatz dazu generierte AP-B das Epitop im geringen Maße und bewirkte weiterhin die Degradation in kleinere Peptide.

Zur Verifizierung des Epitop-Abbaus durch AP-B wurde das HCMVpp65-14mer in einem Ansatz mit AP-B und in einem weiteren Ansatz, in dem das aufgereinigte AP-B mittels Immunpräzipitation depletiert wurde, inkubiert. Die Ansätze wurden nach 0 und 8 Stunden Inkubation massenspektrometrisch analysiert und das Ergebnis in **Abb.3.20** dargestellt.

Die massenspektrometrische Analyse der Prozessierung des HCMVpp65-14mer Peptids durch AP-B zeigte nach 8 Stunden die Generierung des 9mer Epitops (**Abb. 3.20, b, 6-14**) durch Schnitte C-terminal des R<sub>494</sub> (N<sub>6</sub>-V<sub>14</sub>). Weiterhin ist jedoch der deutliche Abbau durch verschiedene Schnitte innerhalb des Epitops zu erkennen. Die Depletion von AP-B durch Immunpräzipitation bestätigt, dass keine Verunreinigung mit einer anderen Peptidase zur Prozessierung des HCMVpp65-14mer Peptids beiträgt, da in diesem Ansatz nach einer Inkubationszeit von 8h kein Substratabbau zu sehen ist (**Abb. 3.20, d**). Die Immunoblotanalyse in **Abb.3.20e** verifiziert die Depletion von AP-B durch Immunpräzipitation, da AP-B aus dem verwendeten Überstand vollständig präzipitiert wurde. Zusätzlich zeigt der Aktivitätstest mittels des fluorogenen AP-B Substrates H-Arg-AMC in **Abb.3.20f**, dass die AP-B Aktivität nach der Depletion deutlich reduziert war.



**Abb. 3.20 Massenspektrometrische Analyse der AP-B-Depletion.** Aufgereinigte AP-B wurde zusammen mit dem AP-B Antikörper inkubiert und der Überstand sowie das aufgereinigte AP-B zur Prozessierung des HCMVpp65-14mer Peptids eingesetzt. a) Massenspektrometrische Analyse der HCMVpp65<sub>490-503</sub> (14mer) Prozessierung durch AP-B nach (a) 0 Stunden und (b) 8 Stunden Inkubation. Analyse des depletierten AP-B (Überstand nach der Immunpräzipitation) nach (c) 0 Stunden und (d) 8h Inkubation mit dem HCMVpp65<sub>490-503</sub> (14mer) Peptid. e) Immunoblotanalyse des aufgerinigten AP-B und des Überstands nach der Immunpräzipitation (AP-B depletiert). f) Aktivitätstest des aufgereinigten AP-B und des Überstands nach der IP (AP-B depletiert) mittels des fluorogenen AP-B Substrates H-Arg-AMC.

Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der HCMVpp65-Prozessierung zeigt deutlich, dass AP-B zur Generierung des HCMVpp65-9mer-Epitops führt, dieses jedoch wei-

terhin degradiert. Damit entspricht das Ergebnis dem Resultat des CTL-Assays in Abschnitt 3.2 und deutet darauf hin, dass AP-B durch den Abbau des HCMVpp65-9mer Epitops einen negativen Einfluss auf die Epitop-Präsentation aufweist. Es ist anzunehmen, dass in gleicher Weise die anderen proteasomal gebildeten pp65 Peptide durch AP-B degradiert werden können.

Im Gegensatz zu AP-B führen jedoch NRDC und verstärkt der AP-B-NRDC-Komplex *in vitro* zur HCMVpp65 Epitop-Generierung, wobei die Befunde des CTL-Assays jedoch die verringerte pp65 Epitop-Präsentation durch NRDC und verstärkt durch den AP-B-NRDC-Komplex aufweisen. Gleichzeitig bewirkte die siRNA-abhängige Reduktion der AP-B und NRDC Proteinexpression jedoch die vermehrte pp65 Expression (Abb.3.5a). Demnach könnte der Peptidase-Komplex auch unabhängig vom Abbau proteasomal generierter Vorläuferpeptide, durch die Verminderung der pp65 Peptidsynthese und der entsprechenden DRIPs im Zytosol, inhibierend auf die MHC-Klasse-I-Präsentation des HCMVpp65 Epitops wirken.



---

## 4 Diskussion

Das HCM-Virus verursacht eine global verbreitete Infektion, für die momentan keine wirkungsvolle Immunisierung verfügbar ist. In immunkompromittierten Individuen, wie z.B. bei Patienten nach Organtransplantationen oder mit gleichzeitiger HIV-Infektion, verursacht das HCM-Virus schwere Krankheitsbilder bis hin zu Todesfällen. In gesunden Individuen wird die HCMV-Infektion effizient durch HCMV spezifische CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten kontrolliert. Die CTL-Antwort richtet sich dabei gegen kurze Peptide, die durch die proteolytische Prozessierung von viralen Proteinen bzw. DRiPs entstehen und durch die Zelloberflächenpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle erkannt werden. Das HCMV-Genom kodiert ca. 150 Proteine, die potentiell als Ziel dieser CTL-Erkennung dienen können (Chee et al, 1990). Die Immunotherapie mittels des adoptiven T-Zell-Transfers HCMV spezifischer CTLs in Patienten nach der Transplantation von Knochenmark und von hämatopoetischen Stammzellen führte zur erfolgreichen Verhinderung der viralen Reaktivierung und der damit assoziierten Erkrankungen (Cobbold et al, 2005; Rauser et al, 2004; Walter et al, 1995). Diese Studien zeigten, dass pp65-spezifische CTLs infizierte Zellen erkennen und damit protektiv wirken (Riddell et al, 1992; Walter et al, 1995). Tatsächlich wird das virale pp65-Antigen bereits zwei Stunden nach der Infektion durch die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert (McLaughlin-Taylor et al, 1994) und kann trotz vorhandener viraler Immunevasions-Mechanismen kontinuierlich auf der Zelloberfläche detektiert werden (Besold et al, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass sogar der größte Anteil der gesamten CTL-Antwort durch pp65-spezifische CTLs vermittelt wird (Wills et al, 1996). Dabei sind die T-Zellen häufig nur auf ein Epitop spezialisiert (Weekes et al, 1999), wie z.B. auf das immundominante HLA-A2-restringierte Epitop pp65<sub>495-503</sub> NLVPMVATV. Der Vorteil dieser Immundominanz des spezifischen pp65-Epitops für den Organismus stellt die Gewährleistung einer schnellen und effizienten Immunantwort dar und ist vermutlich aus der langen Ko-Evolution durch die Virus-Wirtszell-Interaktion hervorgegangen.

Besold et al. demonstrierten in ihren Analysen, dass das immundominante Epitop des pp65-Proteins durch proteasomale Prozessierung innerhalb der Zelle generiert wird (Besold et al, 2007). Ergänzend werden verschiedene N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide, wie z.B. das

14mer (pp65<sub>490-503</sub>, GILARNLVPMVATV) gebildet (Urban et al, 2012). Die generierten Peptide werden anschliessend durch das Proteasom freigesetzt und sind dem Abbau durch zytosolische Peptidasen direkt ausgesetzt. Neben der proteasomalen Prozessierung ist jedoch nur wenig über die Prozessierung durch zytosolische Peptidasen und deren Zusammenspiel bekannt. Letztendlich entkommt nur ein geringer Anteil der Peptide dem Abbau im Zytosol und wird durch einen weiteren wichtigen Mechanismus des MHC-Klasse-I-Präsentationsweges, den TAP-Transport, in das ER-Lumen transportiert. Es konnte gezeigt werden, dass kurze Peptide, wie das minimale HCMVpp65-Epitop und auch 10mer und 11mer Vorläuferpeptide effizient transportiert werden können (Urban et al, 2012). Hingegen werden längere Vorläuferpeptide, wie das 12mer und das 15mer kaum transportiert. Kommt es nicht zu einer effizienten Translokation in das ER, werden die Peptide bzw. die prozessierten Epitope schnell durch zytosolische Peptidasen degradiert (Reits et al, 2003). Dies hat eine verminderte Präsentation des pp65 Antigens auf der Zelloberfläche und damit eine reduzierte CTL-Antwort zur Folge.

Allerdings ist nicht eine konstant starke Präsentation des immundominanten Epitops auf der Zelloberfläche erforderlich. Es konnte gezeigt werden, dass die differenzierte Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche für eine effiziente CTL-Antwort entscheidend ist (Thomas et al, 2011). Thomas et al. zeigten, dass abhängig von der Zahl der Peptid-MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche unterschiedliche Arten der T-Zell-Antwort induziert werden können. So lösen viele Peptid-MHC-Komplexe eine starke und schnelle T-Zell-Antwort aus und wenige Peptid-MHC-Komplexe eine sensitive und gegebenenfalls längere Antwort, indem ein Peptid-MHC-Komplex nacheinander mit mehreren T-Zellen interagiert. Demnach könnte eine zeitliche und quantitative Regulation der Antigenpräsentation für eine effiziente T-Zell-Antwort entscheidend sein. Bei der HCMV-Infektion handelt es sich z.B. meist um eine lebenslang persistierende Infektion, wobei das Virus bzw. dessen Genom latent in Zellen persistiert, ohne sich zu replizieren (Bein et al, 1993). In diesem Fall könnte eine sensitive und dauerhaft anhaltende T-Zell Antwort wichtig sein, um den Organismus vor dem Eintritt in einen lytischen Zyklus zu schützen. Kommt es unter bestimmten Umständen wie z.B. einer Tumorerkrankung oder der Suppression des Immunsystems durch HIV-Infektion zu einer CMV Reaktivierung, tritt das Virus in den lytischen Zyklus mit einer schnellen Replikation ein. Hierbei ist dann eine starke und schnelle T-Zell Antwort von Vorteil um die zügige Virus-

verbreitung effizient einzudämmen. Das Verständnis der Zusammenarbeit einschließlich der Regulation von Peptidase-Aktivitäten ist demnach die Voraussetzung zur erfolgreichen Modifikation der antiviralen Immunantwort und damit auch entscheidend für die Konzeption neuer Vakzinierungsstrategien. Urban et al. zeigten, dass zytosolische Peptidasen wie TPPII, LAP, POP und AP-B negativ auf die pp65-Epitop-Präsentation wirken (Urban et al, 2012). Andere zytosolische Peptidasen, wie TOP, PSA und BH zeigten keinen Einfluss auf die pp65-Epitop-Präsentation. Hingegen führen die ER-Aminopeptidasen ERAPI und ERAPII zur verstärkten Epitop-Generierung. Die bisherigen Befunde zeigten jedoch keine detaillierten Erkenntnisse über das Zusammenwirken bzw. über direkte Interaktionen der verschiedenen zytosolischen Peptidasen, die an der Prozessierung von MHC-Klasse-I-Vorläuferpeptiden beteiligt sind. Die detaillierte Analyse der Regulation der Prozessierung und Präsentation des pp65-Epitops ist jedoch eine Voraussetzung zur Entwicklung von HCMV-Vakzinen. In dieser Arbeit wurde eine Interaktion von zwei zytosolischen Peptidasen identifiziert, welche die Modulation der HCMVpp65 Epitop-Generierung bewirkt.

---

## 4.1 Interaktion zytosolischer Peptidasen und deren Rolle bei der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation des HCMVpp65-Epitops

Analysen von Towne et al. zeigten, dass BH oder LAP defiziente Mäuse keine veränderte Antigenpräsentation aufweisen (Towne et al, 2007). Aufgrund der Annahme, dass unterschiedliche zytosolische Aminopeptidasen funktionell redundant zusammenarbeiten könnten, wurden Mäuse mit gleichzeitiger BH- und LAP-Defizienz analysiert. Die BH- und LAP-defizienten Mäuse zeigten eine erhöhte CTL-Antwort gegen das LCMVgp276 Epitop. Demnach haben BH und LAP zusammen einen negativen Einfluss auf die Antigenpräsentation eines spezifischen Epitops. Dabei könnten sich jedoch die Schnittpräferenzen der beiden Peptidasen überlappen, so dass nur der Doppel-*knockout* einen eindeutig positiven Effekt auf die Epitop-Generierung aufweist. Ein weiteres Beispiel für die Kooperation zweier zytosolischer Peptidasen konnte für PSA und TPPH im Hinblick auf die Generierung des RU-1<sub>34-42</sub> Tumor Epitops *in vitro* gezeigt werden (Levy et al, 2002). Die Peptidasen führten entweder die gleichen Schnitte redundant durch oder arbeiteten sequentiell zusammen, abhängig von Länge und Sequenz der N-terminalen Verlängerung der proteasomal freigesetzten Vorläuferpeptide. Ebenso wurde die sequentielle Zusammenarbeit von NRDC und TOP zur PRAME-Tumor Epitop-Generierung gezeigt, wohingegen TOP prinzipiell einen negativen Einfluss auf die Präsentation verschiedener Epitope aufweist (Kessler et al, 2011). Obwohl die bisherigen Analysen auf das Zusammenwirken von zytosolischen Peptidasen hindeuten, konnten noch keine Aussagen über die Interaktion der Peptidasen zu heterogenen Enzymkomplexen und der Auswirkung auf die Modulation der Antigenpräsentation getroffen werden.

In dieser Arbeit wurden die heteromere Interaktion zytosolischer Peptidasen und die damit einhergehende Modulation der HCMVpp65 Antigenpräsentation analysiert. Die durchgeführten Experimente zur Interaktion der unterschiedlichen zytosolischen Peptidasen mittels TOP-Myc Überexpression zeigten, dass die Peptidasen POP, AP-B und NRDC in der TOP-Myc-Immunpräzipitation ko-präzipitiert werden konnten (**Abb.3.1**). Andererseits weisen die Immunpräzipitationen mit dem AP-B oder NRDC Antikörper in Zellen ohne Überexpression darauf hin, dass die TOP-Myc Überexpression aufgrund der großen Proteinmenge zu unspezifischen Interaktionen innerhalb der Zelle führte, da ohne TOP-Myc-Überexpression ausschliesslich AP-B und NRDC ko-präzipitiert wurden (**Abb.3.2 und 3.4**). Zudem ko-

sedimentierten AP-B und NRDC in der Glycerolgradientenzentrifugation, wobei TOP und POP hauptsächlich in anderen Fraktionen vorkamen (**Abb.3.3**). Da TOP und POP jedoch ebenfalls in der Glycerolgradientenzentrifugation ko-sedimentierten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese beiden Peptidasen miteinander interagieren. In dieser Arbeit wurden allerdings ausschliesslich AP-B und NRDC zusammen aus den Fraktionen des Glycerolgradienten ko-präzipitiert. Die hauptsächliche Ko-Sedimentation von AP-B und NRDC in Fraktionen gemeinsam mit hoch-molekularen Proteinen, wie dem 20S Proteasom, deutet zudem darauf hin, dass AP-B und NRDC innerhalb der Zelle überwiegend zu Enzymkomplexen interagieren. Die Experimente zeigen demnach, dass die zytosolische Aminopeptidase AP-B, die negativ auf die Präsentation des HCMVpp65-Epitops wirkt, zusammen mit der Endopeptidase NRDC, die an der PRAME-Tumor Epitop Generierung beteiligt ist, interagiert.

Die unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Peptidasen in Bezug auf die Generierung oder Zerstörung von proteasomal generierten Vorläuferpeptiden für die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation könnte durch die Interaktion moduliert sein. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Einfluss des AP-B-NRDC-Komplexes auf die Präsentation des immun-dominanten HCMVpp65<sub>495-503</sub>-Epitops analysiert. Hierbei konnte der negative Effekt von AP-B auf die HCMVpp65-Präsentation in CTL-Assays bestätigt werden (**Abb.3.5**). Zudem zeigte die siRNA-abhängige Reduktion der NRDC Proteinexpression ebenfalls einen positiven Effekt auf die Präsentation des HCMVpp65-Antigens (**Abb.3.5**). Damit reduziert NRDC genauso die HCMVpp65-Epitop-Präsentation und weist demzufolge variable Effekte bezüglich der Präsentation unterschiedlicher Epitope auf. Die siRNA-abhängige Verringerung der AP-B und der NRDC Proteinexpression führte ebenfalls zu einer deutlich gesteigerten CTL-Antwort gegen das HCMVpp65-Antigen (**Abb.3.5**). Hierdurch wurde für AP-B und NRDC zusammen die Reduktion der spezifischen Epitop-Präsentation gezeigt, die durch die Interaktion der Peptidasen verstärkt war. Da innerhalb des Zytosols 99% der intrazellulären Peptide zerstört werden bevor sie den TAP-Transporter und das ER erreichen (Reits et al, 2003), ist anzunehmen, dass AP-B und NRDC zusammen vornehmlich am Epitop-Abbau innerhalb des Zytosols beteiligt sind. Folglich würden die Peptidasen durch den Abbau proteasomal generierter Vorläuferpeptide und Epitope die spezifische pp65 Epitop-Präsentation verringern, entsprechend den Befunden des CTL-Assays. Die gezeigte Interaktion der Peptidasen könnte zudem einen verstärkten Abbau der pp65-Vorläuferpeptide im Zytosol bewirken. Demzufolge wurde ange-

nommen, dass eine enzymatische Aktivierung aufgrund der Interaktion der beiden Peptidasen zu einem verstärkten Substratabbau führt. Entsprechend deuteten Befunde von Cadel et al. darauf hin, dass AP-B in Abwesenheit von spezifischen Aktivatoren kaum aktiv ist, da aufgereinigte rekombinante AP-B einen starken Aktivitätsverlust aufwies (Cadel et al, 2004). Übereinstimmend setzte AP-B in der hier vorliegenden Arbeit das fluorogene Peptidsubstrat H-Arg-AMC ebenfalls *in vitro* nur langsam um, obwohl optimale Salzkonzentrationen gemäß den Arbeiten von Foulon et al. gewählt wurden (Foulon et al, 1999). Durch die Kombination mit der Peptidase NRDC wurde der Substratumsatz des H-Arg-AMC Peptidsubstrates jedoch deutlich gesteigert (**Abb. 3.14**). Auch die Prozessierung des AP-B-spezifischen Arg-Enkephalin Substrates wurde durch die Anwesenheit von NRDC um ~50 % verstärkt (**Abb. 3.16**). Somit wirkt NRDC als spezifischer Aktivator für die enzymatische Aktivität von AP-B. Die Interaktion von NRDC mit mMDH bewirkt zudem auch die Steigerung der NRDC Aktivität (Chow et al, 2005). Folglich führt die Bindung von Proteinen an NRDC nicht nur zur Aktivierung des Interaktionspartners, sondern auch zur Aktivierung des NRDC selbst. In Übereinstimmung mit diesem Befund konnte in der hier vorliegenden Arbeit die verstärkte Umsetzung des spezifischen fluorogenen Peptidsubstrates für NRDC durch die Kombination mit AP-B gezeigt werden (**Abb. 3.15**). Da die vermehrte Zugabe von BSA neben geringen Stabilisierungseffekten kaum zur Aktivierung der beiden Peptidasen führte, handelte es sich um die spezifische Steigerung der enzymatischen Aktivität von AP-B durch NRDC und umgekehrt. Zudem kann jedoch eine Substrataktivierung der Peptidasen oder des Peptidase-Komplexes durch die vermehrte Zugabe der fluorogenen Peptidsubstrate nicht ausgeschlossen werden. Allerdings ist ein deutlicher Unterschied der Substratumsetzung zwischen AP-B und NRDC allein und dem AP-B-NRDC-Komplex zu erkennen, wodurch zumindest eine gewisse enzymatische Aktivierung aufgrund der Interaktion bestätigt wird. Diese Befunde zeigten demnach, dass eine Interaktion und damit eine *in vitro* Komplex-Rekonstitution des AP-B-NRDC-Peptidase-Komplexes stattfand, wodurch die Aktivitätssteigerung und effiziente Substratumsetzung beider Enzyme erzielt wurde.

Bisher beschriebene Interaktionen von NRDC mit verschiedenen Proteinen wie z. B. mMDH zeigten, dass ein basischer Abschnitt auf der Oberfläche des bindenden Moleküls mit einer sauren Interaktionsdomäne von NRDC, bestehend aus 43 Glutamat und Aspartat Aminosäuren, interagiert (Hospital & Prat, 2004; Seidah & Prat, 2002; Stricker et al, 2006). In Überein-

stimmung mit diesen Befunden bewirkten erhöhte NaCl-Konzentrationen innerhalb der DEAE-Chromatographie die Dissoziation des AP-B-NRDc-Komplexes (**Abb.3.6**). Dies zeigt, dass es sich ebenfalls um ionische Wechselwirkungen bei der Interaktion von AP-B und NRDc handelt. Vermutlich findet diese Interaktion über die saure Interaktionsdomäne von NRDc und basischen Proteinabschnitten von AP-B statt. Diese Bindung von NRDc an AP-B und umgekehrt würde somit auf einen allosterischen Effekt hinweisen, da NRDc als Effektor vermutlich an einen basischen Proteinabschnitt von AP-B bindet, der ausserhalb des aktiven Zentrums von AP-B lokalisiert ist. Hierdurch würde es zu Konformationsänderungen innerhalb des AP-B-Moleküls kommen, wodurch die gesteigerte AP-B Aktivität erzielt wird. Ebenso bindet AP-B wahrscheinlich an die saure Interaktionsdomäne von NRDc, die sich N-terminal der Substratbindungstasche befindet. Hierdurch würde es gleichermaßen durch Konformationsänderungen innerhalb des NRDc Moleküls zur Aktivitätssteigerung kommen.

Der in dieser Arbeit identifizierte zelluläre Peptidase-Komplex unterscheidet sich jedoch zum Teil von dem *in vitro* rekonstituierten AP-B-NRDc-Komplex in Größe und Struktur. Die Kombination von AP-B und NRDc *in vitro* ergab einen trimeren Peptidase-Komplex mit einem Molekulargewicht von ~280 kDa, bestehend aus zwei Molekülen AP-B und einem Molekül NRDc (**Abb.3.13**). Innerhalb der Zelle besteht zudem jedoch die Möglichkeit, dass zwei trimere Peptidase-Komplexe ein Hexamer bilden, da es zur überwiegenden Sedimentation des AP-B-NRDc-Komplexes bei einem Molekulargewicht von annähernd 700 kDa in der Glycerolgradientenzentrifugation kam (**Abb.3.3**). Dieser hexamere Komplex würde somit ein Molekulargewicht von ~560 kDa aufweisen. Zukünftig sollte ermittelt werden, wodurch diese möglichen Interaktionen von AP-B und NRDc in der Zelle reguliert werden. Beispielsweise könnten verschiedene Stimulationsbedingungen, die während der viralen Infektion auftreten, regulierend wirken. So könnten immunmodulatorische Zytokine, wie Interferon- $\gamma$ , die Komplexbildung der Peptidasen beeinflussen. Gleichzeitig könnte die Interaktion der Peptidasen mit dem viralen Infektionsverlauf korrelieren. Bei der HCMV Infektion persistiert das Virus latent in infizierten Zellen, wodurch es zu einem chronischen Infektionsverlauf kommen kann. Bei einem chronischen Infektionsverlauf könnte es zunehmend zur AP-B-NRDc-Komplexbildung kommen. Hierdurch würde die vermehrte Präsentation des pp65 Epitops verhindert und evtl. eine basale und langanhaltende Immunantwort erzeugt werden. Bei der CMV Reaktivierung oder einer anderen limitierten Infektion mit schneller Virusreplikation

könnte es zu einer verringerten Interaktion von AP-B und NRDC kommen, bzw. zu einer veränderten Komplexstruktur. Hierdurch würde der Abbau der pp65-Vorläuferpeptide reduziert und eine starke Immunantwort erzeugt werden.

Aufgrund der erzielten *in vitro* Komplex-Rekonstitution des trimeren AP-B-NRDC-Komplexes konnten in dieser Arbeit Prozessierungsexperimente mit einem proteasomal generierten HCMVpp65 Vorläuferpeptid durchgeführt werden. Entgegen den Annahmen führte der trimere AP-B-NRDC-Komplex *in vitro* jedoch zu einer verstärkten HCMVpp65 Epitop-Generierung.

## **4.2 Die *in vitro* Prozessierung des HCMVpp65-14mers durch den AP-B-NRDC-Komplex führt zur effizienten Epitop-Generierung**

Das Proteasom generiert aus den synthetischen HCMVpp65-33mer Polypeptiden (pp65<sub>481-513</sub>) das minimale 9mer-Epitop (pp65<sub>495-503</sub>) und verschiedene N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide, u.a. das 14mer (pp65<sub>490-503</sub>) (Urban et al, 2012). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass AP-B den Abbau des proteasomal generierten 14mer Vorläuferpeptids bewirkt (**Abb.3.19 und 3.20**). Hierbei generiert AP-B zuerst das 9mer Epitop durch N-terminale sukzessive Schnitte. Hat AP-B jedoch mit der Prozessierung begonnen, stoppt die Aminopeptidase nicht. Das Epitop wird durch weitere Schnitte von AP-B abgebaut. Da gezeigt wurde, dass verkürzte Peptide, wie das 8mer, nicht mehr von CTLs auf der Zelloberfläche erkannt werden (Urban et al, 2012), wirkt die proteolytische Aktivität von AP-B negativ auf die HCMVpp65 spezifische CTL-Antwort, entsprechend dem Befund des CTL-Assays (**Abb.3.5**).

Aufgrund der Interaktion von AP-B und NRDC wurde die Prozessierung des proteasomal generierten HCMVpp65-14mers ebenfalls durch die zytosolische Peptidase NRDC analysiert. Erwartungsgemäß schneidet NRDC mit endoproteolytischer Aktivität das HCMVpp65-14mer Vorläuferpeptid N-terminal des basischen Aminosäurerestes R<sub>494</sub> und bildet dadurch das



10mer (RNLVPMVATV) Vorläuferpeptid (**Abb.3.17, 3.18 und 3.19**). Schnitte C-terminal des R<sub>494</sub> waren nur selten, wodurch es kaum zur Epitop-Generierung kam. Ausserdem fand kein weiterer Abbau der gebildeten 10mer Produkte durch NRDC statt. Damit führt die Peptidase NRDC im Gegensatz zu AP-B *in vitro* nicht zum Abbau der generierten 10mere bzw. des 9mer Epitops. Auch der trimere AP-B-NRDC-Komplex bewirkte entgegen den Erwartungen verstärkt die Epitop-Generierung und kaum den weiteren Abbau (**Abb.3.17, 3.18 und 3.19**).

Unklar ist hierbei jedoch, welche der beiden Peptidasen, aktiviert durch die Interaktion, den größten Einfluss auf die verstärkte Generierung des finalen Epitops hat. So wies die aufgereinigte AP-B *in vitro* nur eine sehr niedrige Aktivität auf. Das HCMVpp65-14mer Substrat ist zudem ein längeres Substrat für AP-B als z.B. das fluorogene Peptidsubstrat H-Arg-AMC, wodurch die Affinität der Substratbindungstasche von AP-B nochmals herabgesetzt sein könnte. Aufgrund dessen konnte vermutlich in den Prozessierungsexperimenten mit dem pp65-14mer Vorläuferpeptid und AP-B allein nach kürzeren Inkubationszeiten kaum bzw. kein Abbau identifiziert werden (**Abb.3.17**). Erst lange Inkubationszeiten von bis zu 8 Stunden zeigten den deutlichen Abbau des pp65-14mers und weiterhin der 9mer Epitope (**Abb.3.20**). Da mittels der Prozessierung des fluorogenen Peptidsubstrates H-Arg-AMC und des Neuropeptids Arg-Enkephalin die spezifische Aktivierung von AP-B durch NRDC gezeigt werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass die Aktivierung von AP-B innerhalb des AP-B-NRDC-Komplexes zum verstärkten Abbau des 14mers führt (**Abb.3.17**). Im Gegensatz zu AP-B war NRDC allein aktiver und führte auch nach kürzeren Inkubationszeiten zu einem schnellen Abbau des 14mers. Hierbei wurde jedoch hauptsächlich das 10mer (RNLVPMVATV) durch N-terminale Schnitte des R<sub>494</sub> generiert. Der noch effizientere Abbau des 14mers durch den AP-B-NRDC-Komplex könnte demnach auch durch die starke NRDC-Aktivität erklärt werden, wobei ebenfalls zuerst bevorzugt das 10mer entsteht. Da AP-B begünstigt Schnitte C-terminal des basischen Aminosäurerestes Arginin durchführt, könnte AP-B zum N-terminalen *Trimmen* des 10mers führen, wodurch es bei dem Prozessierungsansatz von AP-B und NRDC zusammen letztendlich zur verstärkten Epitop-Generierung (NLVPMVATV) kommt. Somit würde es sich um eine sequentielle Aktivität der beiden Peptidasen bei der HCMVpp65-14mer Prozessierung handeln. Ein weiteres Beispiel für die sequentielle Zusammenarbeit der Endopeptidase NRDC und der Amino-peptidase AP-B stellt die Prozessierung verschiedener Peptidhormone, wie Somatostatin und Glukagon dar (Fontes et al, 2005; Foulon et al, 1997;

Gluschankof & Cohen, 1987; Gomez et al, 1988). Bei diesem Mechanismus schneidet ebenso NRDC mit endoproteolytischer Aktivität N-terminal von basischen Aminosäureresten innerhalb des Peptidhormons. In einem zweiten Schritt übernimmt AP-B das finale N-terminale *Trimmen*. Allerdings zeigten die bisherigen Analysen der Hormonprozessierung keine direkte Interaktion der beiden Peptidasen. Die in der hier vorliegenden Arbeit erstmals gezeigte Interaktion von AP-B und NRDC führte zur Aktivierung beider Peptidaseaktivitäten. Demnach werden vermutlich die sequentiellen proteolytischen Aktivitäten der beiden Peptidasen im pp65-14mer Vorläuferpeptid verstärkt. Damit führt die Komplexbildung von AP-B und NRDC *in vitro* zu einer verstärkten Generierung des HCMVpp65-Epitops. Im Kontrast dazu hat AP-B allein einen negativen Einfluss auf die Epitop-Generierung durch den fortwährenden Abbau des Peptids. Auch im Zusammenhang mit der Hormonprozessierung ist die verstärkte proteolytische Aktivität der beiden Peptidasen aufgrund der Interaktion vermutlich entscheidend, da der AP-B-NRDC-Komplex zur gesteigerten Prozessierung des AP-B-spezifischen Pro-Peptidhormons Arg-Enkephalin führte (**Abb.3.16**).

Da die Resultate der HCMVpp65-14mer-Prozessierung durch NRDC und den AP-B-NRDC-Komplex die starke Akkumulation der 9mer bzw. 10mer Peptide zeigten (**Abb. 3.17; 3.18; 3.19**), besteht die Möglichkeit, dass diese verstärkt generierten Peptide *in vitro* eine Produkt-hemmung der Peptidase-Aktivitäten bewirken. Eine Produkthemmung kann in der Zelle nicht stattfinden, da die generierten Peptide sofort über den TAP-Transporter weitertransportiert werden bzw. ein Abbau durch andere Peptidasen erfolgt.

Die Akkumulation der 9mer bzw. 10mer Peptide durch NRDC und den AP-B-NRDC-Komplex könnte jedoch auch durch Vorliegen eines „molecular ruler“ Mechanismus erklärt werden. Dies wurde z.B. für die ER-Aminopeptidase ERAP1 gezeigt, die Vorläuferpeptide schnell zu einer Länge von 8-9 Aminosäuren *trimmt*, bevor die Schneideaktivität abbricht (York et al. 2002). Nach der durch *in vitro* Prozessierungsanalysen mit rekombinantem humanen ERAP1 und unterschiedlichen N-terminal elongierten Peptiden etablierten Hypothese (Chang et al, 2005) bindet ERAP1 bevorzugt die längeren Peptidsubstrate über den freien C-Terminus in einer weiten Substratbindungstasche. Dabei reicht der N-Terminus des langen Peptids bis in das katalytische Zentrum, wo die Peptide auf eine Länge von 8-9 Aminosäuren geschnitten werden. Durch die Verkürzung der Peptide auf die adäquate Epitop-Länge wird die Bindung des Peptids an ERAP1 geschwächt und es folgt die Akkumulation entsprechender Epitope.

Aktuelle Strukturanalysen von ERAPI zeigten, dass bevorzugt die Bindung längerer Peptidsubstrate zu einer Konformationsänderung führt, die mit einer Re-Orientierung im katalytischen Zentrum einhergeht (Nguyen et al, 2011). Dadurch kommt es zu keinem weiteren Abbau von spezifisch geschnittenen Substraten. Entsprechend dem beschriebenen *molecular ruler* Mechanismus könnte NRDC die Peptidlänge oder die Sequenz der 9mer Epitope erkennen und durch eine verminderte Substrataffinität der 9mere, bzw. 10mere, die weitere Prozessierung der Peptide einstellen. Die Zusammenarbeit der Peptidasen generiert verstärkt die HCMVpp65 Epitope. Durch die möglicherweise bestehende *molecular ruler* Funktion von NRDC werden die Epitope vor einer weiteren Prozessierung geschützt.

Basierend auf dem Ergebnis des CTL-assays, der eine verstärkte Epitop-Präsentation bei verminderter AP-B und NRDC Expression zeigte, wurde angenommen, dass AP-B und NRDC zusammen zum verstärkten Abbau des HCMVpp65 Epitops führen. Im Gegensatz dazu zeigten AP-B und NRDC zusammen *in vitro* die gesteigerte Epitop-Generierung und im Gegensatz zu AP-B nur eine geringe Degradation der gebildeten HCMVpp65-9mere. Die Bindung von NRDC an AP-B führt folglich zuerst zu einer Aktivierung von AP-B und zur verstärkten Epitop-Generierung. Gleichzeitig werden die Schnittpräferenzen von AP-B innerhalb des Epitops scheinbar reduziert. Die in dem zellbasierten System durchgeführten CTL-Experimente sind allerdings nicht mit den *in vitro* durchgeführten Prozessierungsexperimenten eindeutig vergleichbar. Zum einen wird in dem CTL-Assay das pp65-Protein in die Zelle transfiziert, wodurch die proteasomale Aktivität Voraussetzung zur Generierung des 14mers bzw. des 9mers ist, zum anderen wurde *in vitro* nur das 14mer-Peptid in den Prozessierungsexperimenten verwendet. Weiterhin kann die negative Beeinflussung der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation des pp65-Epitops durch den Peptidase-Komplex unabhängig vom Abbau der proteasomal generierten Vorläuferpeptide erfolgen. Dies würde bedeuten, dass der Peptidase-Komplex den MHC-Klasse-I-Antigen-Präsentationsweg an anderer Stelle als durch den Epitop-Abbau negativ beeinflusst. So könnten z.B. bisher unbekannte Peptidasen, die Vorläuferpeptide abbauen, durch den AP-B-NRDC-Komplex aktiviert werden. Diese Peptidasen könnten als inaktive Vorstufen im Zytosol vorliegen und durch den AP-B-NRDC-Komplex im Zuge einer Zymogenaktivierung prozessiert werden. Andererseits zeigten die Befunde von Hearn et al., dass es im Zytosol prinzipiell auch zur Epitop-Generierung kommen kann (Hearn et al, 2010). Demnach könnten noch weitere Peptidasen im Zytosol vorhanden sein, die am

*Trimmen* von proteasomal generierten HCMVpp65 Vorläuferpeptiden beteiligt sind. Der trimer bzw. hexamere AP-B-NRDc-Komplex könnte mit diesen bisher unbekannten Peptidasen, die an der Epitop-Generierung beteiligt sind, interagieren. Dabei könnte es ebenfalls zur Prozessierung durch den Peptidase-Komplex kommen, wodurch die Aktivität dieser unbekannten Peptidasen vermindert wird. Andererseits führt eine verminderte ER-Translokation durch den TAP-Transporter zu einer reduzierten Epitop-Präsentation. Eine Bindung des AP-B-NRDc-Komplexes an den TAP-Transporter könnte möglicherweise den Transport der pp65 Peptide inhibieren und somit die Präsentation des pp65 Epitops auf der Zelloberfläche vermindern.

Die Beeinflussung der MHC-Klasse-I-Epitoppräsentation unabhängig vom Abbau der Epitope kann auch durch eine veränderte zelluläre Lokalisation des AP-B-NRDc-Komplexes erfolgen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass AP-B und NRDc neben der zytosolischen Lokalisation zusammen mit dem Substrat Glukagon in sekretorischen Vesikeln von Langerhans-Zellen in Immunfluoreszenz-Analysen ko-lokalisiert werden konnten (Fontes et al, 2005). Zudem wurde NRDc im Zellkern lokalisiert (Ma et al, 2004). Die Interaktion von AP-B und NRDc zu trimeren oder hexameren Enzymkomplexen kann ebenso zur veränderten Lokalisation des Peptidase-Komplexes in der Zelle führen. Die Wirkung von NRDc und des AP-B-NRDc-Komplexes könnte somit auch mit der zellulären Lokalisation des pp65-Proteins assoziiert sein. Das pp65 Protein wird nach der HCM-Virusinfektion in den Zellkern transportiert (Britt & Vugler, 1987; Dal Monte et al, 1996; Gallina et al, 1996; Sanchez et al, 1998; Schmolke et al, 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass pp65 abhängig von der Zellzyklusphase vermehrt im Zellkern vorkommt, wodurch gleichzeitig die Einleitung des lytischen Zyklus reguliert wird (Arcangeletti et al, 2011). Obwohl das pp65-Antigen ein immundominantes Epitop darstellt, das zur Aktivierung der zellulären Immunantwort führt (Besold et al, 2007), weist es ebenfalls einige Immunevasionsmechanismen auf. Beispielsweise bewirkt pp65 die Phosphorylierung von viralen frühen Proteinen, wodurch deren MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation blockiert wird (Gilbert et al, 1996). Zudem ermöglicht pp65 durch Phosphorylierungen den Abbau von HLA-DR  $\alpha$ -Ketten durch die Akkumulation dieser MHC-Klasse-II Moleküle in Lysosomen (Odeberg et al, 2003). Hierbei ist allerdings noch umstritten ob pp65 selbst eine Protein Kinase Aktivität aufweist oder mit anderen zellulären Kinasen interagiert. Zusätzlich zu den Veränderungen der adaptiven Immunabwehr schützt pp65 Zellen vor der angeborenen

Immunabwehr durch die Inhibierung der Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen. Ermöglicht wird diese Inhibierung durch die Interaktion von pp65 mit dem NKp30 aktivierenden Rezeptor der Natürlichen Killerzellen (Arnon et al, 2005).

Wie pp65 konnte NRDC im Zellkern lokalisiert werden, wobei die Bindung an Polyamine zur verstärkten Detektion von NRDC im Zellkern führte (Ma et al, 2004). Es wurde daher postuliert, dass NRDC am Kern-*Shuttling* beteiligt ist. Möglicherweise sind NRDC und verstärkt der AP-B-NRDC-Komplex für die Regulation des Transports des pp65-Proteins in den Zellkern verantwortlich. Dabei könnte der AP-B-NRDC-Komplex z.B. den Import von großen Mengen des pp65-Proteins in den Zellkern verhindern. Hierdurch würde die Einleitung des lytischen Zyklus verhindert und die vermehrte Synthese des pp65-Proteins blockiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der AP-B-NRDC-Komplex das pp65-Protein verstärkt in den Zellkern importiert. Gleichzeitig könnte die starke Kern-Lokalisation des pp65-Proteins wiederum über einen negativen Rückkopplungsmechanismus zur verminderten Expression des pp65-Proteins führen. Andererseits könnte der AP-B-NRDC-Komplex direkt die Genexpression bzw. die Translation des pp65-Proteins beeinflussen. Hierfür spricht der aktuelle Befund, dass NRDC die Regulation der Transkription durch die Bindung des di-methylierten Histons H3K4 negativ beeinflusst. Durch die Histon-Bindung von NRDC kommt es zur Rekrutierung eines Repressor-Komplexes und zur Inhibition der entsprechenden Proteinexpression (Li et al, 2012). Hierdurch könnte es ebenfalls zur Inhibition der pp65 Proteinexpression kommen. Zudem zeigte die siRNA-abhängige transiente Reduktion der AP-B und NRDC Proteinexpression in HeLa-Zellen in der hier vorliegenden Arbeit eine verstärkte pp65 Proteinexpression (**Abb.3.5a**). Der AP-B-NRDC-Komplex könnte somit innerhalb des Zellkerns verstärkt die Transkription der pp65 Gene inhibieren. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass durch eine veränderte Transkription das Repertoire der MHC-Klasse-I-Peptide moduliert wird, da die Sequenzierung von MHC-Klasse-I assoziierter Peptide Unterschiede in normalen Zellen gegenüber neoplastisch veränderten Zellen aufwies (Fortier et al, 2008). Entsprechend kann eine verminderte Transkription der pp65-Gene auch zur Reduktion der jeweiligen DRiPs im Zytosol führen, wodurch die HCMVpp65-Epitop-Präsentation auf der Zelloberfläche verringert wird. Bei der HCMV-Infektion, die nicht in den lytischen Zyklus eintritt, würde die verminderte pp65-Epitop-Präsentation latent infizierter Zellen somit eine sensitive und langanhaltende

de Immunantwort vermitteln. Gleichzeitig würden auch die beschriebenen Immunevasions-Mechanismen des pp65-Proteins in der Zelle reduziert werden.

Da reichlich vorhandene zytosolische Peptide nicht die Präsentation von DRiPs blockieren, wurde vermutet, dass DRiPs durch sogenannte Immunoribosomen im Zytosol synthetisiert werden (Lev et al, 2010). Diese Kompartimentierung führt zur unterschiedlichen Synthese von viralen Peptiden und zelleigenen Peptiden für die MHC-Klasse-I-Präsentation. Dadurch kommt es zwar zum Wettbewerb unter den DRiPs für die Antigenpräsentation, jedoch nicht zwischen DRiPs und der Vielzahl von zelleigenen Proteinen. Auf diese Weise wird zudem die vermehrte Präsentation der zelleigenen Proteine auf der Zelloberfläche verhindert. Dies ist wichtig, da im Gegensatz zur Translation, die eine Rate von  $10^9$  eingebauten Aminosäuren pro Minute aufweist, nur eine begrenzte Präsentation von ~150 MHC-Klasse-I-Molekülen pro Minute möglich ist (Yewdell et al, 2003). Hierbei müssen geringfügig vorhandene, zellfremde Proteine erkannt werden. Aufgrund der Transfektion mit pp65 sind viele pp65-Proteine und DRiPs in der Zelle vorhanden. Hier wäre die verringerte Transkription der pp65-Gene entscheidend, um der Zelle weiterhin die Möglichkeit zu geben, dass weitere wichtige zellfremde oder auch zelleigene Proteine auf der Zelloberfläche präsentiert werden können. Eine Regulation der Transkription mittels des AP-B-NRDc-Komplexes könnte entsprechend dazu beitragen eine Balance innerhalb der synthetisierten Epitopvorläufer bzw. DRiPs aufrecht zu erhalten, um gleichzeitig die essentielle Epitop-Präsentation und Immunantwort zu gewährleisten. Zukünftig müsste ebenfalls die Assoziation des AP-B-NRDc-Komplexes mit dem TAP-Transporter analysiert werden, da auch der verringerte TAP-Transport von spezifischen Peptiden zur verminderten Epitop-Präsentation beiträgt. Hat ein Transport der HCMVpp65-Peptide durch den TAP-Transporter in das ER stattgefunden, wirken ERAPI und ERAPII positiv auf die Epitop-Generierung (Urban et al, 2012) und die Präsentation kommt bei erfolgreicher Beladung der MHC-Klasse-I-Moleküle zustande.

Die Ergebnisse zeigen insgesamt in cellulo, dass der AP-B-NRDc-Komplex die MHC-Klasse-I-Antigen-Präsentation des HCMVpp65-Epitops negativ beeinflusst. Damit hat der Peptidase-Komplex einen wichtigen Einfluss auf die HCMVpp65 spezifische antivirale Immunantwort. Hierbei könnte der AP-B-NRDc-Komplex jedoch weitere Funktionen unabhängig vom Abbau proteasomal generierter Vorläuferpeptide, wie z.B. die Regulation des Kern-Imports und der Transkription des pp65-Proteins, haben. Der AP-B-NRDc-Komplex stellt somit eine wichtige

Komponente bei der HCM-Virus-Infektion dar, die einen grossen Teil der Weltbevölkerung betrifft. Da das Virus latent in Zellen persistiert und erst nach einer Reaktivierung in den lytischen Zyklus eintritt, könnte der AP-B-NRDc Komplex hierbei von Bedeutung sein. Zukünftig könnten weitere Untersuchungen der Wirkung des AP-B-NRDc-Komplexes innerhalb HCMV-infizierter Zellen wichtig für die Entwicklung von Vakzinierungsstrategien sein.

Anhand der Interaktion von AP-B und NRDc konnte in der hier vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass die verschiedenen Peptidasen im Zytosol nicht als unabhängige Enzyme innerhalb des MHC-Klasse-I-Antigen-Präsentationsweges betrachtet werden dürfen. Vielmehr finden Interaktionen mit Auswirkungen auf die Enzymaktivitäten und die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation statt. Interessant ist es, zukünftig weitere Substrate, Interaktionspartner und Regulatoren des AP-B-NRDc-Komplexes zu identifizieren.

## 5 Literaturverzeichnis

Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* **74**: 342-352

Andrade MA, Petosa C, O'Donoghue SI, Muller CW, Bork P (2001) Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J Mol Biol* **309**: 1-18

Androlewicz MJ, Anderson KS, Cresswell P (1993) Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 9130-9134

Arcangeletti MC, Rodighiero I, Mirandola P, De Conto F, Covan S, Germini D, Razin S, Dettori G, Chezzi C (2011) Cell-cycle-dependent localization of human cytomegalovirus UL83 phosphoprotein in the nucleolus and modulation of viral gene expression in human embryo fibroblasts in vitro. *J Cell Biochem* **112**: 307-317

Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, Gazit R, Gonen-Gross T, Hanna J, Nahari E, Porgador A, Honigman A, Plachter B, Mevorach D, Wolf DG, Mandelboim O (2005) Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* **6**: 515-523

Balogh A, Cadel S, Foulon T, Picart R, Der Garabedian A, Rousselet A, Tougard C, Cohen P (1998) Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Cell Sci* **111** ( Pt 2): 161-169

Barry M, Bleackley RC (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* **2**: 401-409

Bein G, Bitsch A, Hoyer J, Steinhoff J, Fricke L, Machnik H, Dennin R, Kirchner H (1993) A longitudinal prospective study of cytomegalovirus pp65 antigenemia in renal transplant recipients. *Transpl Int* **6**: 185-190

Belhacene N, Mari B, Rossi B, Auberger P (1993) Characterization and purification of T lymphocyte aminopeptidase B: a putative marker of T cell activation. *Eur J Immunol* **23**: 1948-1955

Besold K, Frankenberg N, Pepperl-Klindworth S, Kuball J, Theobald M, Hahn G, Plachter B (2007) Processing and MHC class I presentation of human cytomegalovirus pp65-derived peptides persist despite gpUS2-11-mediated immune evasion. *J Gen Virol* **88**: 1429-1439



- Britt WJ, Vugler L (1987) Structural and immunological characterization of the intracellular forms of an abundant 68,000 Mr human cytomegalovirus protein. *J Gen Virol* **68** ( Pt 7): 1897-1907
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* **273**: 27765-27767
- Cadel S, Foulon T, Viron A, Balogh A, Midol-Monnet S, Noel N, Cohen P (1997) Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A4 hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2963-2968
- Cadel S, Gouzy-Darmon C, Petres S, Piesse C, Pham VL, Beinfeld MC, Cohen P, Foulon T (2004) Expression and purification of rat recombinant aminopeptidase B secreted from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* **36**: 19-30
- Cadel S, Pierotti AR, Foulon T, Creminon C, Barre N, Segretain D, Cohen P (1995) Aminopeptidase-B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules. *Mol Cell Endocrinol* **110**: 149-160
- Chang SC, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL (2005) The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17107-17112
- Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA, 3rd, Kouzarides T, Martignetti JA, et al. (1990) Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**: 125-169
- Chesneau V, Pierotti AR, Barre N, Creminon C, Tougaard C, Cohen P (1994a) Isolation and characterization of a dibasic selective metalloendopeptidase from rat testes that cleaves at the amino terminus of arginine residues. *J Biol Chem* **269**: 2056-2061
- Chesneau V, Pierotti AR, Prat A, Gaudoux F, Foulon T, Cohen P (1994b) N-arginine dibasic convertase (NRD convertase): a newcomer to the family of processing endopeptidases. An overview. *Biochimie* **76**: 234-240
- Chesneau V, Prat A, Segretain D, Hospital V, Dupaix A, Foulon T, Jegou B, Cohen P (1996) NRD convertase: a putative processing endoprotease associated with the axoneme and the manchette in late spermatids. *J Cell Sci* **109** ( Pt 11): 2737-2745
- Chow KM, Ma Z, Cai J, Pierce WM, Hersh LB (2005) Nardilysin facilitates complex formation between mitochondrial malate dehydrogenase and citrate synthase. *Biochim Biophys Acta* **1723**: 292-301

- Chow KM, Oakley O, Goodman J, Ma Z, Juliano MA, Juliano L, Hersh LB (2003) Nardilysin cleaves peptides at monobasic sites. *Biochemistry* **42**: 2239-2244
- Ciechanover A (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**: 13-21
- Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, Tauro S, McDonald D, Osman H, Assenmacher M, Billingham L, Steward C, Crawley C, Olavarria E, Goldman J, Chakraverty R, Mahendra P, Craddock C, Moss PA (2005) Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* **202**: 379-386
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326** ( Pt 1): 1-16
- Csuhai E, Juliano MA, Pyrek JS, Harms AC, Juliano L, Hersh LB (1999) New fluorogenic substrates for N-arginine dibasic convertase. *Anal Biochem* **269**: 149-154
- Cunningham DF, O'Connor B (1997) Identification and initial characterisation of a N-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal (Z-Pro-prolinal)-insensitive 7-(N-benzyloxycarbonyl-glycyl-prolyl-amido)-4-methylcoumarin (Z-Gly-Pro-NH-Mec)-hydrolysing peptidase in bovine serum. *Eur J Biochem* **244**: 900-903
- Dal Monte P, Bessia C, Landini MP, Michelson S (1996) Expression of human cytomegalovirus ppUL83 (pp65) in a stable cell line and its association with metaphase chromosomes. *J Gen Virol* **77** ( Pt 10): 2591-2596
- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **30**: 10363-10370
- Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M (1992) Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* **267**: 22369-22377
- Felber JP, Coombs TL, Vallee BL (1962) The mechanism of inhibition of carboxypeptidase A by 1,10-phenanthroline. *Biochemistry* **1**: 231-238
- Firat E, Huai J, Saveanu L, Gaedicke S, Aichele P, Eichmann K, van Endert P, Niedermann G (2007a) Analysis of direct and cross-presentation of antigens in TPPII knockout mice. *J Immunol* **179**: 8137-8145
- Firat E, Saveanu L, Aichele P, Stacheli P, Huai J, Gaedicke S, Nil A, Besin G, Kanzler B, van Endert P, Niedermann G (2007b) The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J Immunol* **178**: 2241-2248
- Fontes G, Lajoix AD, Bergeron F, Cadel S, Prat A, Foulon T, Gross R, Dalle S, Le-Nguyen D, Tribillac F, Bataille D (2005) Miniglucagon (MG)-generating endopeptidase, which processes

glucagon into MG, is composed of N-arginine dibasic convertase and aminopeptidase B. *Endocrinology* **146**: 702-712

Fortier MH, Caron E, Hardy MP, Voisin G, Lemieux S, Perreault C, Thibault P (2008) The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J Exp Med* **205**: 595-610

Foulon T, Cadel S, Cohen P (1999) Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 747-750

Foulon T, Cadel S, Prat A, Chesneau V, Hospital V, Segretain D, Cohen P (1997) NRD convertase and aminopeptidase B: two processing metallopeptidases with a selectivity for basic residues. *Ann Endocrinol (Paris)* **58**: 357-364

Gallina A, Percivalle E, Simoncini L, Revello MG, Gerna G, Milanesi G (1996) Human cytomegalovirus pp65 lower matrix phosphoprotein harbours two transplantable nuclear localization signals. *J Gen Virol* **77** ( Pt 6): 1151-1157

Garcia-Horsman JA, Mannisto PT, Venalainen JI (2007) On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* **41**: 1-24

Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA (1996) An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* **274**: 209-219

Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD (1996) Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* **383**: 720-722

Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**: 615-623

Gluschkof P, Cohen P (1987) Proteolytic enzymes in the post-translational processing of polypeptide hormone precursors. *Neurochem Res* **12**: 951-958

Gluschkof P, Gomez S, Morel A, Cohen P (1987) Enzymes that process somatostatin precursors. A novel endoprotease that cleaves before the arginine-lysine doublet is involved in somatostatin-28 convertase activity of rat brain cortex. *J Biol Chem* **262**: 9615-9620

Gomez S, Gluschkof P, Lepage A, Cohen P (1988) Relationship between endo- and exopeptidases in a processing enzyme system: activation of an endoprotease by the aminopeptidase B-like activity in somatostatin-28 convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5468-5472

Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA, Barford D (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* **96**: 99-110

Guil S, Rodriguez-Castro M, Aguilar F, Villasevil EM, Anton LC, Del Val M (2006) Need for tripeptidyl-peptidase II in major histocompatibility complex class I viral antigen processing when proteasomes are detrimental. *J Biol Chem* **281**: 39925-39934

Hammer GE, Gonzalez F, Champsaur M, Cado D, Shastri N (2006) The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol* **7**: 103-112

Hattori A, Tsujimoto M (2004) Processing of antigenic peptides by aminopeptidases. *Biol Pharm Bull* **27**: 777-780

Hearn A, York IA, Bishop C, Rock KL (2010) Characterizing the specificity and cooperation of aminopeptidases in the cytosol and endoplasmic reticulum during MHC class I antigen presentation. *J Immunol* **184**: 4725-4732

Hiraoka Y, Ohno M, Yoshida K, Okawa K, Tomimoto H, Kita T, Nishi E (2007) Enhancement of alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein by a metalloendopeptidase nardilysin. *J Neurochem* **102**: 1595-1605

Hook V, Yasothornsrikul S, Greenbaum D, Medzihradszky KF, Troutner K, Toneff T, Bunday R, Logrinova A, Reinheckel T, Peters C, Bogoy M (2004) Cathepsin L and Arg/Lys aminopeptidase: a distinct prohormone processing pathway for the biosynthesis of peptide neurotransmitters and hormones. *Biol Chem* **385**: 473-480

Hooper NM (1994) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* **354**: 1-6

Hooper NM, Turner AJ (2002) The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* **9**: 1107-1119

Hospital F, Goldringer I, Openshaw S (2000) Efficient marker-based recurrent selection for multiple quantitative trait loci. *Genet Res* **75**: 357-368

Hospital V, Nishi E, Klagsbrun M, Cohen P, Seidah NG, Prat A (2002) The metalloendopeptidase nardilysin (NRDC) is potently inhibited by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF). *Biochem J* **367**: 229-238

Hospital V, Prat A (2004) Nardilysin, a basic residues specific metallopeptidase that mediates cell migration and proliferation. *Protein Pept Lett* **11**: 501-508

Hospital V, Prat A, Joulie C, Cherif D, Day R, Cohen P (1997) Human and rat testis express two mRNA species encoding variants of NRD convertase, a metalloendopeptidase of the insulinasin family. *Biochem J* **327** ( Pt 3): 773-779

Jones EY (1997) MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* **9**: 75-79

Kamphuis IG, Drenth J, Baker EN (1985) Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J Mol Biol* **182**: 317-329

Kessler JH, Khan S, Seifert U, Le Gall S, Chow KM, Paschen A, Bres-Vloemans SA, de Ru A, van Montfoort N, Franken KL, Benckhuijsen WE, Brooks JM, van Hall T, Ray K, Mulder A, Doxiadis, II, van Swieten PF, Overkleeft HS, Prat A, Tomkinson B, Neefjes J, Kloetzel PM, Rodgers DW, Hersch LB, Drijfhout JW, van Veelen PA, Ossendorp F, Melief CJ (2011) Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nat Immunol* **12**: 45-53

Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL (1999) The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **274**: 3363-3371

Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS, Peterson E, Pennington MW, Ploegh HL, Thornberry NA, Goldberg AL (2003) The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem* **278**: 35869-35877

Kleijmeer MJ, Kelly A, Geuze HJ, Slot JW, Townsend A, Trowsdale J (1992) Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* **357**: 342-344

Kloetzel PM (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 179-187

Kloetzel PM (2004) The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* **1695**: 225-233

Kloetzel PM, Ossendorp F (2004) Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **16**: 76-81

Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K, Ishiura S (1999) Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* **343 Pt 2**: 371-375

Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3922-3927

Lefterov IM, Koldamova RP, Lazo JS (2000) Human bleomycin hydrolase regulates the secretion of amyloid precursor protein. *FASEB J* **14**: 1837-1847

Lev A, Princiotta MF, Zanker D, Takeda K, Gibbs JS, Kumagai C, Waffarn E, Dolan BP, Burgevin A, Van Endert P, Chen W, Bennink JR, Yewdell JW (2010) Compartmentalized MHC class I antigen processing enhances immunosurveillance by circumventing the law of mass action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 6964-6969

Lew RA, Tetaz TJ, Glucksman MJ, Roberts JL, Smith AI (1994) Evidence for a two-step mechanism of gonadotropin-releasing hormone metabolism by prolyl endopeptidase and metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 in ovine hypothalamic extracts. *J Biol Chem* **269**: 12626-12632

Levy F, Burri L, Morel S, Peitrequin AL, Levy N, Bachi A, Hellman U, Van den Eynde BJ, Servis C (2002) The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J Immunol* **169**: 4161-4171

Li J, Chu M, Wang S, Chan D, Qi S, Wu M, Zhou Z, Nishi E, Qin J, Wong J (2012) Identification and characterization of nardilysin as a novel dimethyl H3K4-binding protein involved in transcriptional regulation. *J Biol Chem* **287**: 10089-10098

Ma Z, Chow KM, Csuha E, Hersh LB (2002) The use of proteolysis to study the structure of nardilysin. *Arch Biochem Biophys* **401**: 198-204

Ma Z, Chow KM, Yao J, Hersh LB (2004) Nuclear shuttling of the peptidase nardilysin. *Arch Biochem Biophys* **422**: 153-160

Ma Z, Wang X, Hockman S, Snow EC, Hersh LB (2005) Subcellular localization of nardilysin during mouse oocyte maturation. *Arch Biochem Biophys* **434**: 187-194

Marti T, Molberg O, Li Q, Gray GM, Khosla C, Sollid LM (2005) Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten: chemical and immunological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **312**: 19-26

McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman SJ, Tanamachi B, Li CR, Zaia JA, Greenberg PD, Riddell SR (1994) Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8<sup>+</sup> virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* **43**: 103-110

Momburg F, Roelse J, Hammerling GJ, Neefjes JJ (1994) Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med* **179**: 1613-1623

Morgunov I, Srere PA (1998) Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase. Substrate channeling of oxaloacetate. *J Biol Chem* **273**: 29540-29544

- Muskardin DT, Voelkel NF, Fitzpatrick FA (1994) Modulation of pulmonary leukotriene formation and perfusion pressure by bestatin, an inhibitor of leukotriene A4 hydrolase. *Biochem Pharmacol* **48**: 131-137
- Nagase H (2001) Metalloproteases. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 21**: Unit 21 24
- Nagase H, Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**: 21491-21494
- Neurath H (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**: 350-357
- Neurath H (1989) Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem Sci* **14**: 268-271
- Nguyen TT, Chang SC, Evnouchidou I, York IA, Zikos C, Rock KL, Goldberg AL, Stratikos E, Stern LJ (2011) Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 604-613
- Nishi E, Hiraoka Y, Yoshida K, Okawa K, Kita T (2006) Nardilysin enhances ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor through activation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme. *J Biol Chem* **281**: 31164-31172
- Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W, Schirle M, Stevanovic S, Dietz K, Heinemeyer W, Groll M, Wolf DH, Huber R, Rammensee HG, Schild H (1998) Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12504-12509
- Odeberg J, Plachter B, Branden L, Soderberg-Naucler C (2003) Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain. *Blood* **101**: 4870-4877
- Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P (1994) MHC class I/beta 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* **368**: 864-867
- Page MJ, Di Cera E (2008) Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1220-1236
- Pham VL, Cadel MS, Gouzy-Darmon C, Hanquez C, Beinfeld MC, Nicolas P, Etchebest C, Foulon T (2007) Aminopeptidase B, a glucagon-processing enzyme: site directed mutagenesis of the Zn<sup>2+</sup>-binding motif and molecular modelling. *BMC Biochem* **8**: 21
- Pierotti AR, Prat A, Chesneau V, Gaudoux F, Leseney AM, Foulon T, Cohen P (1994) N-arginine dibasic convertase, a metalloendopeptidase as a prototype of a class of processing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6078-6082

Pineau C, McCool S, Glucksman MJ, Jegou B, Pierotti AR (1999) Distribution of thimet oligopeptidase (E.C. 3.4.24.15) in human and rat testes. *J Cell Sci* **112** ( Pt 20): 3455-3462

Polgar L (1994) Prolyl oligopeptidases. *Methods Enzymol* **244**: 188-200

Rammensee HG, Friede T, Stevanović S (1995) MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* **41**: 178-228

Rauser G, Einsele H, Sinzger C, Wernet D, Kuntz G, Assenmacher M, Campbell JD, Topp MS (2004) Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood* **103**: 3565-3572

Rawlings ND, Barrett AJ (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **290** ( Pt 1): 205-218

Rawlings ND, Barrett AJ (1999) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **27**: 325-331

Ray K, Hines CS, Coll-Rodriguez J, Rodgers DW (2004) Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. *J Biol Chem* **279**: 20480-20489

Reits E, Griekspoor A, Neijssen J, Groothuis T, Jalink K, van Veelen P, Janssen H, Calafat J, Drijfhout JW, Neefjes J (2003) Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**: 97-108

Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijfhout JW, Neefjes J (2004) A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* **20**: 495-506

Reits EA, Vos JC, Gromme M, Neefjes J (2000) The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* **404**: 774-778

Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD (1992) Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**: 238-241

Rock KL, York IA, Goldberg AL (2004) Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol* **5**: 670-677

Rock KL, York IA, Saric T, Goldberg AL (2002) Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* **80**: 1-70



- Rockel B, Peters J, Kuhlmorgen B, Glaeser RM, Baumeister W (2002) A giant protease with a twist: the TPP II complex from *Drosophila* studied by electron microscopy. *EMBO J* **21**: 5979-5984
- Roelse J, Gromme M, Momburg F, Hammerling G, Neefjes J (1994) Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J Exp Med* **180**: 1591-1597
- Roizman B, Carmichael LE, Deinhardt F, de-The G, Nahmias AJ, Plowright W, Rapp F, Sheldrick P, Takahashi M, Wolf K (1981) Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **16**: 201-217
- Sanchez V, Angeletti PC, Engler JA, Britt WJ (1998) Localization of human cytomegalovirus structural proteins to the nuclear matrix of infected human fibroblasts. *J Virol* **72**: 3321-3329
- Saric T, Beninga J, Graef CI, Akopian TN, Rock KL, Goldberg AL (2001) Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. *J Biol Chem* **276**: 36474-36481
- Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y, Greer F, Schomburg L, Fruci D, Niedermann G, van Endert PM (2005) Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* **6**: 689-697
- Schmolke S, Drescher P, Jahn G, Plachter B (1995) Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. *J Virol* **69**: 1071-1078
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**: 770-774
- Seidah NG, Prat A (2002) Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem* **38**: 79-94
- Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schroter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel PM, Kruger E (2010) Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* **142**: 613-624
- Seifert U, Maranon C, Shmueli A, Desoutter JF, Wesoloski L, Janek K, Henklein P, Diescher S, Andrieu M, de la Salle H, Weinschenk T, Schild H, Laderach D, Galy A, Haas G, Kloetzel

PM, Reiss Y, Hosmalin A (2003) An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* **4**: 375-379

Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N (2002) ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**: 480-483

Stavropoulou V, Vasquez V, Cereser B, Freda E, Masucci MG (2006) TPPII promotes genetic instability by allowing the escape from apoptosis of cells with activated mitotic checkpoints. *Biochem Biophys Res Commun* **346**: 415-425

Stoltze L, Dick TP, Deeg M, Pommerl B, Rammensee HG, Schild H (1998) Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur J Immunol* **28**: 4029-4036

Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2000) Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* **1**: 413-418

Stricker R, Chow KM, Walther D, Hanck T, Hersh LB, Reiser G (2006) Interaction of the brain-specific protein p42IP4/centaurin- $\alpha$ 1 with the peptidase nardilysin is regulated by the cognate ligands of p42IP4, PtdIns(3,4,5)P3 and Ins(1,3,4,5)P4, with stereospecificity. *J Neurochem* **98**: 343-354

Taylor A (1993a) Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J* **7**: 290-298

Taylor A (1993b) Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *Trends Biochem Sci* **18**: 167-171

Thomas S, Xue SA, Bangham CR, Jakobsen BK, Morris EC, Stauss HJ (2011) Human T cells expressing affinity-matured TCR display accelerated responses but fail to recognize low density of MHC-peptide antigen. *Blood* **118**: 319-329

Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2001) Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* **194**: 1-12

Tomkinson B, Lindas AC (2005) Tripeptidyl-peptidase II: a multi-purpose peptidase. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 1933-1937

Towne CF, York IA, Neijssen J, Karow ML, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Neefjes JJ, Rock KL (2005) Leucine aminopeptidase is not essential for trimming peptides in

the cytosol or generating epitopes for MHC class I antigen presentation. *J Immunol* **175**: 6605-6614

Towne CF, York IA, Neijssen J, Karow ML, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Neefjes JJ, Rock KL (2008) Puromycin-sensitive aminopeptidase limits MHC class I presentation in dendritic cells but does not affect CD8 T cell responses during viral infections. *J Immunol* **180**: 1704-1712

Towne CF, York IA, Watkin LB, Lazo JS, Rock KL (2007) Analysis of the role of bleomycin hydrolase in antigen presentation and the generation of CD8 T cell responses. *J Immunol* **178**: 6923-6930

Umezawa H, Aoyagi T, Ohuchi S, Okuyama A, Suda H, Takita T, Hamada M, Takeuchi T (1983) Arphamenines A and B, new inhibitors of aminopeptidase B, produced by bacteria. *J Antibiot (Tokyo)* **36**: 1572-1575

Umezawa H, Aoyagi T, Suda H, Hamada M, Takeuchi T (1976) Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* **29**: 97-99

Urban S, Textoris-Taube K, Reimann B, Janek K, Dannenberg T, Ebstein F, Seifert C, Zhao F, Kessler JH, Halenius A, Henklein P, Paschke J, Cadel S, Bernhard H, Ossendorp F, Foulon T, Schadendorf D, Paschen A, Seifert U (2012) The Efficiency of Human Cytomegalovirus pp65495-503 CD8+ T Cell Epitope Generation Is Determined by the Balanced Activities of Cytosolic and Endoplasmic Reticulum-Resident Peptidases. *J Immunol*

Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR (1995) Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* **333**: 1038-1044

Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Carmichael AJ, Sissons JG (1999) The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J Virol* **73**: 2099-2108

Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, Sissons JG (1996) The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* **70**: 7569-7579

Wu TJ, Pierotti AR, Jakubowski M, Sheward WJ, Glucksman MJ, Smith AI, King JC, Fink G, Roberts JL (1997) Endopeptidase EC 3.4.24.15 presence in the rat median eminence and hypophysial portal blood and its modulation of the luteinizing hormone surge. *J Neuroendocrinol* **9**: 813-822

Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL (2008) The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* **8**: 607-618

Yan J, Parekh VV, Mendez-Fernandez Y, Olivares-Villagomez D, Dragovic S, Hill T, Roopenian DC, Joyce S, Van Kaer L (2006) In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *J Exp Med* **203**: 647-659

Yewdell JW (2005) The seven dirty little secrets of major histocompatibility complex class I antigen processing. *Immunol Rev* **207**: 8-18

Yewdell JW, Reits E, Neefjes J (2003) Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **3**: 952-961

York IA, Goldberg AL, Mo XY, Rock KL (1999) Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* **172**: 49-66

York IA, Mo AX, Lemerise K, Zeng W, Shen Y, Abraham CR, Saric T, Goldberg AL, Rock KL (2003) The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* **18**: 429-440

## Abkürzungsverzeichnis

Ak Antikörper  
AP-B Aminopeptidase B  
ATP Adenosintriphosphat  
BH Bleomycin Hydrolase  
BSA bovines Serum Albumin  
CRT Calretikulin  
CNX Calnexin  
CTL zytotoxische T Lymphozyten  
DEAE Diethylaminoethyl  
DMSO Dimethylsulfoxid  
DRiPs Defekte Ribosomale Produkte  
ECL enhanced chemiluminescence  
ER Endoplasmatisches Retikulum  
ERAPI ER Aminopeptidase I  
ERAPII ER Aminopeptidase II  
FCS fötales Kälberserum  
FPLC fast protein liquid chromatography  
GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase  
HBS Hepes buffered saline  
HCMV Humaner Zytomegalievirus  
HIV Humanes Immundefizienz Virus  
HPLC high performance liquid chromatography  
IP Immunpräzipitation  
kDa Kilodalton  
LAP Leucyl Aminopeptidase  
LCMV Lymphozytäres Choriomeningitis Virus  
LTA<sub>4</sub> Leukotrien A<sub>4</sub>  
LTA<sub>4</sub>H Leukotrien A<sub>4</sub> Hydrolase  
MHC major histocompatibility complex

mMDH mitochondiale Malat Dehydrogenase  
NRDc N-Arginine Dibasic Convertase/ Nardilysin  
PAGE Polyacrylamid Gelelektrophorese  
PBS phosphate buffered saline  
pH pH-Wert (potentia Hydrogenii)  
POP Prolyl Oligopeptidase  
pp65 Phosphoprotein 65  
PSA Pyromycin-sensitive Aminopeptidase  
SDS Natriumdodecylsulfat  
siRNA small interfering RNA  
TAP transporter associated with antigen processing  
TCA Trichloressigsäure  
TEMED Tetramethylethylendiamin  
TFA Triflouressigsäure  
TOP Thimet Oligopeptidase  
Tpn Tapasin  
TPPII Tripeptidyl Peptidase II  
UPS Ubiquitin Proteasom System  
VSV Vesicular Stomatitis Virus  
WB Western Blot

## Publikationen

### Publikationen:

Mikael Altun, Bin Zhao, Kelly Velasco, Haiyin Liu, Gerco C. Hassink, **Julia Paschke**, Teresa Pereira, Kristina Lindsten

The ubiquitin specific protease 19 (USP19) regulates the hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) during hypoxia. The Journal of Biological Chemistry 2011 Nov 29

Sabrina Urban, Kathrin Textoris-Taube, Barbara Reimann, Katharina Janek, Tanja Dannenberg, Frédéric Ebstein, Christin Seifert, Fang Zhao, Jan H. Kessler, Anne Halenius, Petra Henklein, **Julia Paschke**, Sandrine Cadel, Helga Bernhard, Ferry Ossendorp, Thierry Foulon, Dirk Schadendorf, Annette Paschen and Ulrike Seifert

The efficiency of HCMV pp65<sub>495-503</sub> CD8<sup>+</sup> T cell epitope generation is determined by the balanced activities of cytosolic and ER-resident peptidases. Journal of Immunology 2012 Jun 15

### Poster Beitrag

**Julia Paschke**, Sabrina Urban, Jan Kessler, Barbara Reimann, Annette Paschen, Burkhardt Dahlmann, Peter-Michael Kloetzel, Ulrike Seifert

Complex formation of cytosolic peptidases relevant for MHC class I antigen processing  
14th International Immunology Congress, Kobe, Japan, August 2010

Stockholm, Juni 2012

(Julia Paschke)

## **Danksagung**

Ich bedanke mich in erster Linie ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Peter-Michael Kloetzel, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seinem Institut dieses interessante Thema zu bearbeiten und mir stets mit gutem Rat beiseite stand.

Als nächstes gilt mein außerordentlicher Dank meiner Betreuerin Frau Professor Dr. Ulrike Seifert, in derer Arbeitsgruppe ich meine Arbeit unter exzellenter Betreuung durchführen konnte. Frau Prof. Dr. Seifert hat mich bei allen praktischen und theoretischen Fragestellungen intensiv unterstützt und mir viele Tipps und Anregungen gegeben. Ich bedanke mich bei der gesamten AG Kloetzel und besonders bei der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Seifert (ehemaliges Labor 007). Dabei gilt mein spezieller Dank Elke Bürger, die mir mit vielen praktischen Tipps im Laboralltag weiterhelfen konnte. Ich bedanke mich bei Frau PD Dr. Paschen und dem Universitätsklinikum Essen für die fachliche und finanzielle Unterstützung meines Projektes.

Ich möchte mich außerdem ganz herzlich bei allen Gutachtern und Mitgliedern des Promotionsausschusses für Ihre Mühe bedanken.

Weiterhin gilt ein ganz besonderes Dankeschön den ehemaligen und jetzigen Doktoranden, mit denen ich jeden Tag sehr viel Freude und interessante Gespräche hatte. Dabei gilt mein großer Dank Sabrina Urban, die mir auch mit vielen fachlichen Ratschlägen beiseite stand. Weiterhin danke ich Anne Wiemhöfer, Nicole Lange, Annika Warnatsch und Carolin Schächterle.

Außerhalb des Labors bedanke ich mich bei Angelika, Katrin, Owe, Daniela, Jörg, Xia und Lei, die mir durch viele schöne Stunden und ein offenes Ohr diese Arbeit ebenfalls erleichtert haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Sven bedanken, der mir mit sehr viel Geduld und Zuversicht beiseite stand und mich stets aufgemuntert hat.



## Danksagung

---

Zum Schluss bedanke ich mich ganz, ganz besonders bei meinen Eltern, ohne sie wäre ich nie so weit gekommen. Danke, dass Ihr mich stets in allen Lebensphasen ausnahmslos unterstützt habt und mir dadurch diese Arbeit ermöglicht habt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Stockholm, Juni 2012

(Julia Paschke)